

Analysen zur Identifizierung einer spezifischen Sulfurtransferase für die Molybdäncofaktor Biosynthese in *Escherichia coli*

Vom Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Andrea Bolte (geb. Freuer)
aus Hannover

1. Referentin : Prof. Dr. Silke Leimkühler

2. Referent : Prof. Dr. Ralf-R. Mendel

eingereicht am : 09. Mai 2005

mündliche Prüfung (Disputation) am: 19. Juli 2005

2005

Meinen Eltern

Vorveröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fachbereichs für Biowissenschaften und Psychologie, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgendem Beitrag vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge (Poster)

Andrea Freuer, Ralf R. Mendel and Silke Leimkühler

Role of the sulfurtransferases IscS, CSD and CsdB for the biosynthesis of the molybdenum cofactor in *Escherichia coli*.

International meeting on Iron sulfur-proteins: Biogenesis, Structure, Function, Pathogenesis and Evolution; Marburg 2002

Andrea Freuer, Andreas Matthies, Manfred Nimtz, and Silke Leimkühler

Identification of a potential sulfurtransferase involved in the generation of the dithiolene moiety of Molybdopterin in *Escherichia coli*

31st Steenbock Symposium: FeS-Proteins: Biogenesis, Structure and Function; Madison (USA) May 19-22,2005

Abkürzungen

A	Adenin
Å	Angström
Abb.	Abbildung
Ade	Adenin
AMP	Adenosinmonophosphat
amp	Ampicillin
AO	Aldehydoxidase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-p-Toluidin-Salz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
β-Gal	β-Galaktosidase
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
C	Kohlenstoff
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CD-Spektroskopie	Circuläre Dichroismus Spektroskopie
cm	Chloramphenicol
<i>cnx</i>	Bezeichnung der Chlorat-Resistenz vermittelnden Gene in Pflanzen
CTAB	Cethyltrimethylammoniumbromid
C-Term	Carboxyterminus
Cys	Cystein
Da	Dalton
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
ddNTP	didesoxy-Nukleosidtriphosphat

DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylen Glycol-bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetat Säure
EK	Enterokinase
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
ε	Extinktionskoeffizient
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fe	Eisen
g, mg, μ g	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
Gly	Glycin
G	Guanin
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanison-Triphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HeCh	schwere Kette des Antikörpers
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
His	Histidin
H ₂ O	Wasser
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IgG	Immunoglobulin
IMP	Inosinmonophosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
J ₂	Jod
kana	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
KCN	Kaliumcyanid
kDa	Kilodalton
KJ	Kaliumjodid
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter

LB	Luria Broth
Leu	Leucin
mm, µm, nm	Millimeter, Mikrometer, Nanometer
M, mM, nM, µM	molar, millimolar, nanomolar, mikromolar
MeOH	Methanol
Met	Methionin
Mg	Magnesium
MGD	Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid
min	Minute
mind.	mindestens
Mo	Molybdän
Moco	Molybdäncofaktor
MOCS	Bezeichnung für Molybdäncofaktor-Synthese Proteine in Säugern
MOPS	3-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MPT	Molybdopterin
mRNA	„messenger“-RNA
MS	Massenspektrometrie
MST	3-Mercaptopyruvat:Cyanid Sulfurtransferase
MW	Molekulargewicht
MWCO	Molekulargewicht Ausschlußgröße (molecular weight cut off)
N ₂	Stickstoff
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenindinukleotid (Phosphat) reduziert
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenindinukleotid oxidiert
NaOH	Natriumhydroxid
NED	Naphthyl-Ethylendiamin
NH ₃	Ammoniak
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NMR	kernmagnetische Resonanz (nuclear magnetic resonance)
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NP40	Nonidet P-40
NR	Nitratreduktase
N-Term	Aminoterminus

O ₂	molekularer Sauerstoff
OD	optische Dichte
ONPG	2-Nitrophenyl-beta-D-galactopyranosid
ori	„origin of replication“ (Replikationsursprung)
Ω	Ohm
P	Phosphat
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
Rhd	Rhodanese-ähnliche Domäne
RhdA	Rhodanese-Protein aus <i>Azotobacter vinelandii</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuclease
rpm	Umdrehung pro Minute („rotations per minute“)
RT	Raumtemperatur
S	Schwefel
SA	Sulfanilamid
s	Sekunde
SD	Hefe-Mangelmedium
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SO	Sulfitoxidase
s.u.	siehe unten
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAP-Methode	“Tandem Affinity Purification” Methode
TBS	„tris buffered saline“
TE	Tris-EDTA-Puffer
Thio	Thiosulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
TST	Thiosulfat:Cyanid Sulfurtransferase
U	Einheit der Enzymaktivität, „unit“

upm	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	ultraviolettes Licht
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen-Verhältnis
Vol	Volumen
W	Watt
wt	Wildtyp
XDH	Xanthindehydrogenase
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl- β -D-galactosid
XO	Xanthinoxidase
YPD	Hefemedium
z.B.	zum Beispiel

Abkürzungen für Artnamen

<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Bedeutung des Molybdäns in biologischen Systemen	1
1.2	Der Molybdäncofaktor	1
1.3	Die Struktur des Molybdäncofaktors	2
1.4	Die Biosynthese des Molybdäncofaktors in <i>E. coli</i>	3
1.5	Die Synthese des Precursor Z	4
1.6	Die Konversion von Precursor Z zu MPT	6
1.7	Molybdän-Insertion und Moco-Bildung	7
1.8	Der Schwefeltransfer im zweiten Schritt der <i>E. coli</i> Moco-Biosynthese	8
1.9	Die Familie der Rhodanesen	15
1.10	<i>E. coli</i> Rhodanesen	18
1.11	Ziel der Arbeit	21
2.	Ergebnisse	22
2.1	Analyse der Sulfitoxidase Aktivität in den <i>E. coli</i> <i>iscS</i> , <i>csdA</i> , <i>csdB</i> und <i>csdA/csdB</i> Mutantenstämmen	22
2.2	Charakterisierung von Rhodanese-ähnlichen Proteinen in <i>E. coli</i>	23
2.2.1	Aufreinigung der <i>E. coli</i> Rhodanesen ThiI und GlpE	23
2.2.2	<i>In vitro</i> Aktivierung der inaktiven MPT-Synthase durch die Thiosulfat: Cyanid Sulfurtransferasen ThiI, GlpE und Rinder-Rhodanese	25
2.2.3	Reinigung von SseA und YceA, zwei Rhodanese-ähnliche Proteine mit einer zusätzlichen Protein-Domäne	26
2.2.4	Die <i>E. coli</i> Einzeldomänen-Rhodanesen YgaP und PspE	26
2.2.4.1	Klonierung und Expression von PspE(R) und YgaP(R)	27
2.2.5	Molekulargewichtsbestimmung von YgaPR, PspER und GlpE	29
2.2.6	Analyse der Sulfurtransferase-Aktivitäten von YgaPR	31
2.2.6.1	K_m Wertbestimmung für YgaPR	32
2.2.7	Analyse der Persulfidbindung durch Fluoreszenz-Quenching	33
2.2.8	Sekundärstruktur-Analyse der <i>E. coli</i> Einzeldomänen-Rhodanesen GlpE, PspER und YgaPR durch CD-Spektroskopie	36
2.2.8.1	Detektion der Sekundärstruktur von GlpE, PspER und YgaPR nach Bildung der Persulfid-Gruppe	37
2.2.9	Untersuchung der Nitratreduktase-Aktivität in <i>E. coli</i> Rhodanese-Mutantenstämmen	39
2.3	<i>In vivo</i> Interaktionsuntersuchungen von MoeB und MoaD anhand des Hefe Tri-Hybrid Systems	39
2.3.1	Analyse des Tri-Hybrid Screens	40
2.4	Die Tandem Affinity Purification (TAP) Methode	41
2.4.1	Kontrolle der TAP-Konstrukte auf <i>in vivo</i> Aktivität	43

2.4.2	Untersuchung von <i>in vivo</i> Protein-Interaktionen anhand der TAP-Methode	44
2.5	Charakterisierung der <i>E. coli</i> Rhodanese YnjE	48
2.5.1	Co-Expression von YnjE in der TAP-Methode	48
2.5.2	Expression und Aufreinigung von YnjE	49
2.5.2.1	Analyse der Sulfurtransferaseaktivität von YnjE mit Thiosulfat, β -Mercaptopyruvat und L-Cystein als Schwefeldonoren	50
2.5.3	Analyse der Konformationsänderung bei Schwefelbeladung durch „Fern-UV“ CD-Spektroskopie	51
2.5.4	<i>In vitro</i> Assemblierung von YnjE, MoeB und inaktiver MPT-Synthase	52
2.5.4.1	Immunoblot-Analyse der in der <i>in vitro</i> Assemblierung detektierten 30 kDa Bande	53
2.5.5	Immunpräzipitation von MoeB, inaktiver MPT-Synthase und den <i>E. coli</i> Rhodanesen YnjE, GlpE, PspER und YgaPR	54
2.5.6	Identifizierung von <i>in vivo</i> Protein-Protein Interaktionen zwischen MoeB und verschiedenen <i>E. coli</i> Rhodanesen anhand des Hefe Two-Hybrid Systems	57
2.5.6.1	Vergleich der <i>in vivo</i> Protein-Protein-Interaktionen anhand des β -Galaktosidase Liquid Assay	59
2.5.7	Analyse des Schwefeltransfers von einer L-Cystein Desulfurase auf YnjE	62
2.5.8	Analyse der Funktion von YnjE für die <i>E.coli</i> Moco-Biosynthese	65
2.5.9	Massenspektrometrischer Nachweis der Schwefelübertragung von IscS auf YnjE	67
3.	Diskussion	69
3.1	Sind die L-Cystein Desulfurasen CSD und CsdB an der <i>in vivo</i> MPT-Synthese in <i>E.coli</i> beteiligt?	69
3.2	Funktionelle und strukturelle Unterschiede der <i>E. coli</i> Einzeldomänen-Rhodanesen GlpE, PspER und YgaPR	70
3.3	Ist eine Rhodanese an der <i>in vivo</i> Aktivierung der <i>E. coli</i> MPT-Synthase involviert?	71
3.4	<i>In vivo</i> Interaktionspartner von MoeB und MoaD im eukaryotischen Tri-Hybrid System	73
3.5	Identifizierung der <i>E. coli</i> Rhodanese YnjE in der TAP-Methode	75
3.6	Charakterisierung der <i>E. coli</i> Rhodanese YnjE	76
3.6.1	Sulfurtransferase-Aktivität von YnjE	77
3.6.2	YnjE interagiert <i>in vitro</i> mit MoeB und MoaE	78
3.6.3	Überträgt IscS den Schwefel auf YnjE?	79
3.6.4	Sind IscS und YnjE an der <i>E. coli</i> MPT-Synthese beteiligt?	80
3.7	Modell des Schwefelübertragung im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese in <i>E. coli</i>	81

4.	Material und Methoden	83
4.1	Material	83
4.1.1	Verwendete Medien, Puffer und Lösungen	83
4.1.2	Verwendete Chemikalien und Enzyme	83
4.1.3	Bakterien- und Hefestämme	83
4.1.4	Verwendete Plasmide	84
4.2	Molekularbiologische Arbeiten	85
4.2.1	Klonierungstechniken	85
4.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	85
4.2.3	DNA-Sequenzierung	86
4.3	Proteinbiochemische Arbeiten	86
4.3.1	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	86
4.3.2	Expression und Aufreinigung der <i>E. coli</i> Rhodanese-ähnlichen Proteine GlpE, YgaPR, PspER und YnjE	86
4.3.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	87
4.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	87
4.3.5	Immunoblot-Analyse	87
4.4	Analytische Methoden	88
4.4.1	Chemischer Nachweis von Intermediaten der Molybdäncofaktor-Biosynthese (Form A Bestimmung)	88
4.4.2	Gelfiltration	90
4.4.3	Nitratreduktase-Overlay zur qualitativen Bestimmung der <i>E. coli</i> Nitratreduktase-Aktivität	90
4.4.4	Quantitative Bestimmung der Nitratreduktase-Aktivität	91
4.4.5	Cytochrom c-Assay zur Bestimmung der Sulfitoxidase-Aktivität	92
4.4.6	Sörbos-Assay zur Detektion der Sulfurtransferase-Aktivität	92
4.4.7	DTT Assay	92
4.5	Die „Tandem Affinity Purification“ (TAP) Methode	93
4.6	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)	95
4.7	Circularer Dichroismus (CD) Spektroskopie	97
4.8	Fluoreszenz-Quenching	98
4.9	Immunpräzipitation	98
4.10	Das Hefe Two- und Tri-Hybrid System	99
4.10.1	Herstellung kompetenter <i>S. cerevisiae</i> Zellen	100
4.10.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mittels LiAc/PEG-Methode	100
4.10.3	„Library Scale“ Co-Transformation	100
4.10.4	Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	101
4.10.5	Klonierung der pBridge™ Konstrukte für das Tri-Hybrid System	102
4.10.6	Klonierung der Two-Hybrid Konstrukte für die <i>in vivo</i> Analyse direkter Protein-Interaktionen	102
4.10.7	β-Galaktosidase-Filter-Assay	103

4.10.8	β-Galaktosidase-Liquid-Assay	103
4.10.9	Herstellung elektro-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	104
4.10.10	Elektroporation	104
5.	Literaturverzeichnis	106
6.	Anhang	118
6.1	Primer	118
6.2	Plasmide	119
	Zusammenfassung	121

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung des Molybdäns in biologischen Systemen

Das Spurenelement Molybdän, ein Übergangsmetall der 6. Nebengruppe, spielt in allen biologischen Systemen eine essentielle Rolle. Schon seit Beginn des letzten Jahrhunderts war die biologische Relevanz des Molybdäns für das Wachstum von Pflanzen und Mikroorganismen bekannt (1), dabei blieb jedoch die aktive Form des Molybdäns lange Zeit unerforscht. Vor etwa 60 Jahren wurden die ersten Molybdän-Mangelerscheinungen bei Nutzpflanzen beschrieben (zusammengefasst in 2) und konnten auf einen Verlust der Nitratreduktase (NR) Aktivität zurückgeführt werden. Die NR katalysiert die Schlüsselreaktion der anorganischen Stickstoff-Assimilation und ist das wichtigste Molybdän-assoziierte Enzym in Pflanzen. Zu den weiteren Mo-Enzymen höherer Pflanzen gehören mehrere Aldehydoxidasen (AOs), die im Purin-Katabolismus beteiligte Xanthindehydrogenase (XDH) (3) und die Sulfitoxidase (SO) (4). Die AOs fungieren als Schlüsselenzyme in der Phytohormonsynthese von Abscisin- und Indolelessigsäure (5,6,7), wohingegen für die pflanzliche SO bislang keine eindeutige physiologische Funktion gezeigt werden konnte.

Der erste Hinweis für eine Enzymassoziiierung des Molybdäns und dessen Bedeutung für Mensch und Tier konnte durch den Nachweis von Molybdän in der Xanthinoxidase aus Rattenleber gezeigt werden (8). Wenig später konnte die Molybdän-Abhängigkeit für weitere Enzyme wie der tierischen Aldehydoxidase (9) und der Nitratreduktase aus dem Ascomyceten *Neurospora crassa* (10) bestätigt werden. Das für den Menschen wichtigste Molybdoenzym, die SO, wurde erst 1971 durch Cohen *et al.* (11) identifiziert. Ein Verlust der SO-Aktivität hat meist letale Folgen und führt zum frühzeitigen Tod nach der Geburt (100).

Die über 40 bekannten, vorwiegend bakteriellen Molybdän-enthaltenden Enzyme, katalysieren grundlegende Reaktionen des Stickstoff-, Schwefel- und Sauerstoffmetabolismus (12,13,14).

1.2 Der Molybdäncofaktor

Mit der genetischen Analyse des filamentösen Pilzes *Aspergillus nidulans* wurde der Grundstein zur Untersuchung des Molybdän-Metabolismus gelegt. Cove und Pateman (15) isolierten sechs NR-Mutanten, von denen fünf einen simultanen Verlust der NR- und XDH-Aktivität zeigten. Da die einzige Gemeinsamkeit dieser

Enzyme ihre Molybdän-Abhängigkeit war, wurde von Patemann *et al.* (16) die Existenz eines identischen Molybdäncofaktor (Moco) postuliert. Die Bezeichnung der für die Synthese des Moco verantwortlichen Genloci *cnx* (cofaktor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase) spiegelt den pleiotropen Charakter dieser Mutanten wider. Die Namensgebung *cnx* wurde für Pflanzen beibehalten, wohingegen die entsprechenden Loci für Bakterien die Operon-Bezeichnungen „*moa*, *mob*, *mod*, *moe*, *mog*“ (32) und für Säuger die Bezeichnung „*mocs*“ (molybdenum cofactor synthesis) (33) eingeführt wurden. Bis heute konnten gleichartige Mutanten auch für *Neurospora crassa* (17,18), *E. coli* (19), *Drosophila melanogaster* (20) sowie höhere Pflanzen (21) beschrieben werden. Erste Hinweise auf eine ubiquitäre und universelle Struktur des Moco lieferten Experimente mit der *nit1*-Mutante. Nason *et al.* (22) konnten zeigen, dass es möglich war, inaktive Apo-NR der *nit1*-Mutante durch tierische, pflanzliche und bakterielle Moco-haltige Extrakte funktionell zu komplementieren. Lediglich die Nitrogenase war als einziges der Molybdänhaltigen Enzyme nicht zur Komplementation der *nit1*-Mutante in der Lage. Der Grund dafür ist ihr bislang einzigartiger Fe-Moco (23).

1.3 Die Struktur des Molybdäncofaktors

Aufgrund der Oxidationssensitivität und der daraus bedingten Instabilität des Moco wurde ein Großteil der chemischen Strukturanalysen des Mocos an seinen Degradations- und Oxidationsprodukten durchgeführt. Als strukturelle organische Komponente wurde ein Pterin identifiziert (24). Anhand der stabilen Oxidationsprodukte Form A und Form B konnte wenig später eine vier C-Atome umfassende Seitenkette mit einem terminalen Phosphatester am C6-Atom des Pterin analysiert werden (25). Die auf der strukturellen Homologie zwischen Form B und dem Metaboliten Urothion basierende Anwesenheit von Schwefel im Moco (26) konnte 1987 von Kramer *et al.* (27) in Form einer Dithiolengruppe an den C1- und C2-Atomen der Seitenkette durch eine spezifische Alkylierung mit Iodacetamid nachgewiesen werden. Daraufhin wurde als erstes Modell für den aktiven Moco ein vollreduziertes bizyklisches Tetrahydropteringerüst vorgeschlagen, über dessen Dithiolengruppen das Molybdän-Atom gebunden ist (27). Seitdem wird die Molybdän-enthaltende aktive Form des Molybdän-Cofaktors als Moco, und die Molybdän-freie inaktive Form als Molybdopterin (MPT) bezeichnet. Erst durch die Kristallisation der Aldehydoxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas* konnte 1995 die tatsächliche Struktur

gelöst werden (28). Der einzige Unterschied zu dem vorgeschlagenen Modell, war die trizyklische Struktur durch die Ausbildung eines Pyranorings zwischen dem C3-Atom der Seitenkette und dem C7-Atom des Pterins (Abb). Durch Kristallisation weiterer Molybdo-Enzyme konnte das Vorliegen des Moco als 5,6,7,8-Tetrahydropyranopterin bestätigt werden (29,30). Zudem zeigte sich, dass in Bakterien eine Modifizierung des Moco stattfindet, in der über eine Pyrophosphatbindung am C4-Atom der Seitenkette des MPTs ein Nukleotid gebunden ist (31). Die Grundstruktur des Mocos ist in allen Organismenreichen identisch (Abb.1.1).

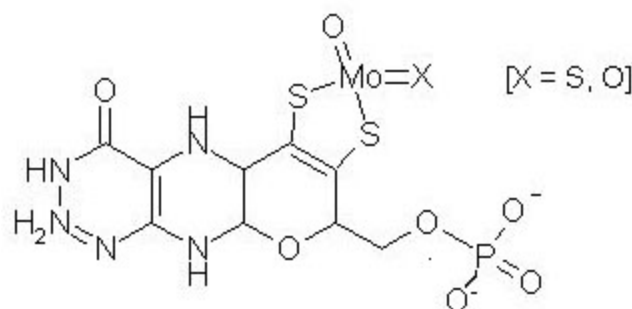


Abb.1.1 Strukturformel des Molybdäncofaktors

Die dargestellte Form des Molybdäncofaktors zeigt die bestätigte Struktur des 5,6,7,8-Tetrahydropyranopterin.

1.4 Die Biosynthese des Molybdäncofaktors in *E. coli*

Aufgrund der konservierten Struktur und des Vorkommens des Moco in allen Organismenreichen wurde angenommen, dass der Mechanismus der Molybdäncofaktor-Biosynthese in allen Organismen ähnlich ablaufen muss (36).

Die Synthese des Moco ist am besten in *E. coli* untersucht. Es zeigte sich, dass mehr als 15 Gene auf insgesamt fünf Mo-Operonen an der Moco-Synthese in *E. coli* beteiligt sind (34). Das derzeit gültige Modell der Moco-Biosynthese (zusammengefasst durch Rajagopalan 1996 (35)) lässt sich in drei Abschnitte unterteilen und ist ein klassisches Beispiel eines mehrstufigen Grundstoffwechselweges. Ausgehend von einem GTP wird der schwefelfreie Precursor Z gebildet und im zweiten Schritt durch Schwefel-Inkorporation zu MPT umgesetzt. Durch Komplexierung des Molybdäns an die Dithiolengruppen des MPT-Gerüsts und die für Eubakterien spezifische Anheftung des Nukleotids entsteht die aktive

Dinukleotid-Form des Cofaktors. Mittlerweile sind für die meisten der bakteriellen Moco-Biosynthese-Proteine die entsprechenden homologen eukaryotischen Proteine aus *A. thaliana* und *Homo sapiens* bekannt und beschrieben (37). Die einzelnen Reaktionsschritte werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

1.5 Die Synthese des Precursor Z

Ähnlich wie bei der Biosynthese anderer biologisch relevanter Pterine, ist auch bei der Moco-Biosynthese GTP die postulierte Ausgangsverbindung (41). In der Synthese von Biopterin, Flavinen (38) oder Folaten (39) wird die Ringerweiterung am GTP unter Katalyse der Cyclohydrolasen I oder II initiiert. Die Analyse Cyclohydrolase-defizienter humaner Zelllinien hat gezeigt, dass die Aktivität des Moco-Enzyms SO nicht beeinträchtigt ist, wodurch es sich in der Moco-Biosynthese um einen neuen Pterin-Syntheseweg handeln muss (40). *In vivo* Untersuchungen mit radioaktiv markiertem GTP zeigten, dass alle Kohlenstoffatome in aufgereinigtem PrecursorZ wiedergefunden und das C8-Atom des GTPs an der C2'-Position des PrecursorZ lokalisiert werden konnte (41). Aufgrund dessen wurde eine alternativer, Cyclohydrolase-ähnlicher Reaktionsmechanismus postuliert (Abb. 1.2) (41). Durch Hydrolyse wird der Imidazolring des Guanins linearisiert und es kommt zu einer Umlagerung der Ribose. Auf das C2'-Atom des entstehenden Intermediats wird eine, aus dem C8 Kohlenstoff des Guanins hervorgegangene, Formyl-Gruppe übertragen. Sie wird zwischen die C2' und C3' Position der Seitenkette inseriert. Der Pterin-Ring wird durch Wassereliminierung geschlossen, wodurch ein phosphoryliertes Dihydropterin mit einer vier Kohlenstoff Atome umfassenden sechs-Alkyl-Seitenkette entsteht. Diese wird cyclisiert, wobei es zu einem Verlust zweier Phosphate kommen muss, falls GTP das natürliche Edukt der Reaktion ist. Rieder *et al.* (6) konnten anhand von NMR-Analysen bestätigen, dass alle Atome des GTP in Precursor Z eingehen, allerdings postulieren sie eine über ein Thioester Enzym-gebundene Formylgruppe. Anhand spektroskopischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Precursor Z vorwiegend in der Tetrahydropyranopterin-Form mit zwei Diolgruppen an der C1'-Position vorliegt, was die Chiralität des C6-Atoms bewahren, die Anfälligkeit gegen Luftoxidation verringern und die gerichtete Schwefelinsertion zur MPT-Bildung gewährleisten soll (42).

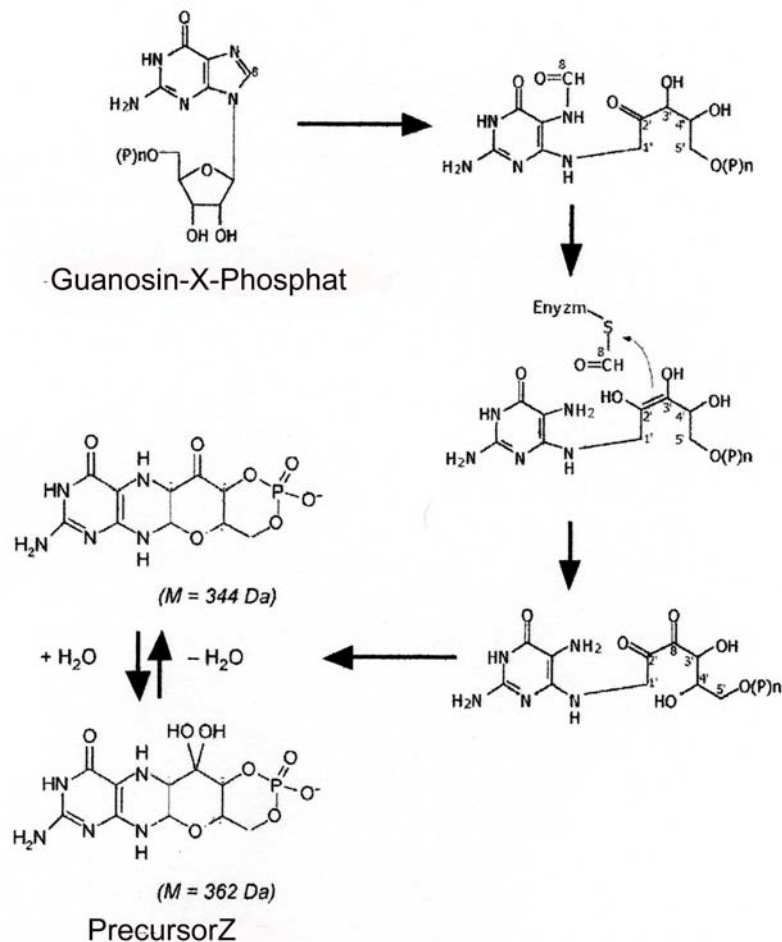


Abb.1.2 Die Synthese von Precursor Z

Ein Guanosinderivat wird über die dargestellten möglichen Intermediate in Precursor Z umgewandelt. Dabei wird das C8-Atom in Form einer Formyl-Gruppe zwischen die C2' und C3' Position der Ribose inseriert. Precursor Z ist in seiner Tetrahydropyrano Form gezeigt mit zwei Diolgruppen an der C1' Position gezeigt.

In *E. coli* katalysieren die Proteine MoeA und MoeC die Synthese von Precursor Z. MoeA besitzt zwei Cystein-Cluster, die an einer Eisen-Schwefel-Cluster Bindung beteiligt sind (43). In *A. thaliana* (Cnx2 und Cnx3 (44)) und im Menschen (MOCS1A und MOCS1B (45)) konnten jeweils homologe Proteine gefunden werden. MoeA und seinen Homologen gehören zu der neuen Protein-Superfamilie der "Radikal-S-Adenosylmethionin (SAM) Proteinen" (46). Durch reduktive Spaltung von SAM über ein Eisen-Schwefel-Cluster können radikale Verbindungen entstehen. Welche genaue Rolle diese bei der Precursor Z-Synthese spielen, ist bislang noch ungeklärt. Für das in MOCS1A und allen Homologen hochkonservierte C-terminale Doppel-Glycin Motiv konnte eine funktionelle Relevanz gezeigt werden (47). Diese könnte in der Bildung des postulierten Thioesters mit der zu übertragenden Formylgruppe (C8-

Atom) bestehen. Für MoaC konnte bislang nur die Kristallstruktur geklärt werden. Es handelt sich dabei um ein Hexamer, das aus MoaC-Homodimeren gebildet wird, wobei das hypothetische aktive Zentrum an den Berührungspunkten zwischen zwei Monomeren liegt (48). In welcher Weise MoaA und MoaC im ersten Schritt der Moco-Biosynthese miteinander interagieren, ist bislang nicht bekannt.

1.6 Die Konversion von Precursor Z zu MPT

Im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese findet die Konversion von Precursor Z zu Molybdopterin (MPT) statt, indem zwei Schwefel-Atome an die C1'- und C2' Position des Precursor Z eingebaut werden. Diese Reaktion wird durch die MPT-Synthase katalysiert (49,50), einem heterotetrameren Enzym aus zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten (51, 52). In *E. coli* besteht die MPT-Synthase aus den Proteinen MoaE (große Untereinheit, je ~ 16850 Da) und MoaD (kleine Untereinheit; je ~ 8750 Da). Es konnte gezeigt werden, dass MoaD das schwefeltragende Protein ist, da es im Gegensatz zu MoaE sensitiv gegenüber Sulfhydrylreagenzien wie N-Ethylmaleimid, N-Bromobiman und Iodoacetamid reagiert (53). Massenspektrometrische Analysen inaktiver MPT-Synthase (aus einer *moeB*-Mutante aufgereinigt) ergaben im Vergleich zu aktiver MPT-Synthase eine Differenz für MoaD von 16 Da. Dieser Größenunterschied entspricht dem Austausch eines Sauerstoffs gegen einen Schwefel, woraufhin die Ausbildung einer aktiven Thiocarboxylatgruppe an dem C-terminalen Doppelglycinmotiv von MoaD postuliert wurde (53). Um katalytisch arbeiten zu können, muss demnach die kleine Untereinheit der MPT-Synthase thiocarboxyliert werden. In *E. coli* ist daran das Protein MoeB beteiligt. Unter ATP-Verbrauch kommt zur Ausbildung eines MoeB-MoaD-Acyl-Adenylat Komplexes, wodurch die kleine Untereinheit MoaD aktiviert wird. Nach der Aktivierung wird der Schwefel von einer noch nicht identifizierten Sulfurtransferase auf MoaD übertragen. Das thiocarboxylierte MoaD dissoziiert anschließend von MoeB, bindet an MoaE und bildet die aktive MPT-Synthase. *In vitro* Analysen zeigten, dass es möglich ist, die kleine Untereinheit durch verschiedene Sulfurtransferasen zu thiocarboxylieren, indem L-Cystein als Schwefelquelle fungiert (57). Eine spezifische *in vivo* Sulfurase konnte bislang nicht identifiziert werden.

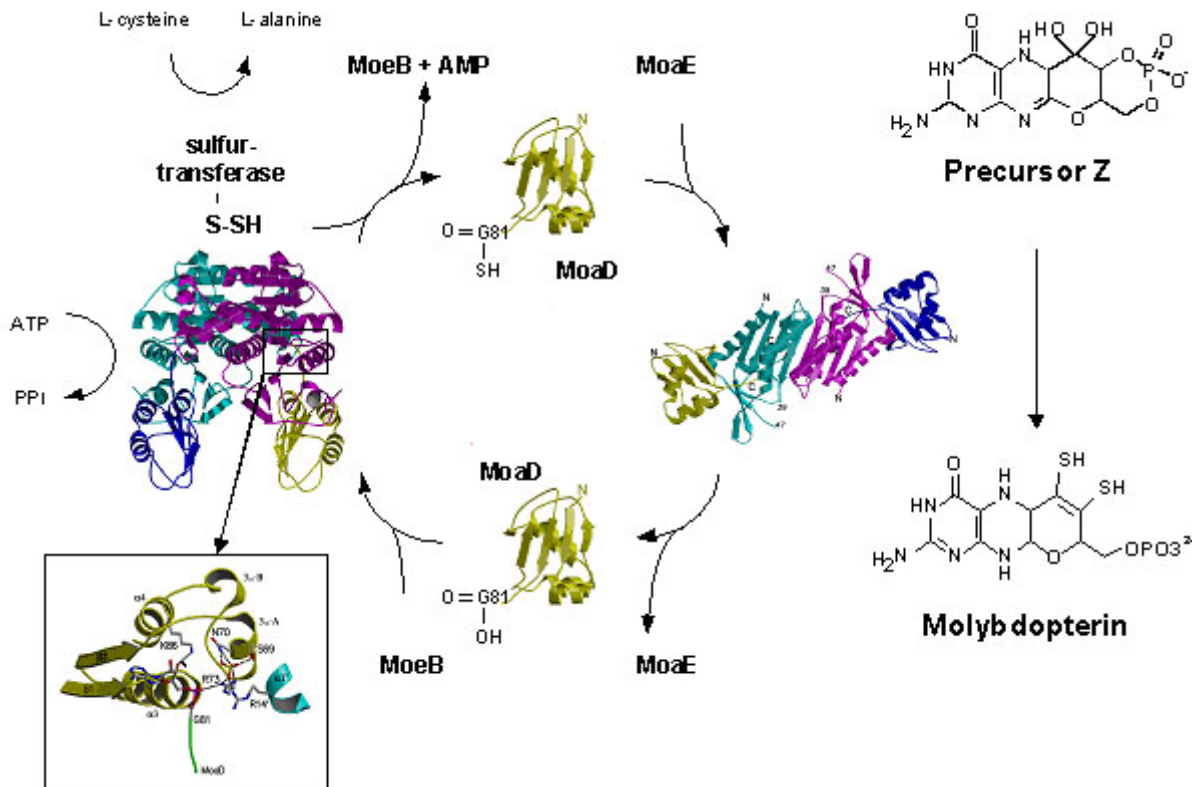


Abb.1.3 Der zweite Schritt der *E. coli* Moco-Biosynthese

Im zweiten Schritt findet die Konversion von Precursor Z zu MPT durch die MPT-Synthase statt. Um katalytisch aktiv zu sein, muss die kleine Untereinheit der MPT-Synthase, MoeD, sulfuriert werden. Dafür löst sich das carboxylierte MoeD von der großen Untereinheit, MoeE, und bindet an das MoeB-Dimer. Unter ATP-Verbrauch kommt es zur Ausbildung des sogenannten Acyl-Adenylatkomplex, wodurch MoeD aktiviert und durch eine noch unbekannte Sulfurtransferase sulfuriert wird. Als Schwefelquelle wird L-Cystein postuliert. Das thiocarboxylierte MoeD dissoziiert anschließend wieder von MoeB, bindet an MoeE und bildet so die aktive MPT-Synthase.

1.7 Molybdän-Insertion und Moco-Bildung

Durch Einbau des Molybdän an das MPT-Grundgerüst, wird der aktive Moco gebildet. Dabei kodiert das *mod* Operon für Proteine, die einen hochaffinen Molybdätransporter bilden (59). An der Mo-Inkorporation sind die Proteine MogA und MoeA beteiligt, deren Strukturen aufgeklärt werden konnten (62). MogA bildet ein Homotrimer, bei dem jedes MogA-Monomer aus einem Kern von β -Faltblättern besteht, der von α -Helices umgeben ist (60). MoeA, in seiner aktiven Form, besteht aus zwei Domänen, von denen eine Domäne eine strukturelle Verwandtschaft zu

MogA aufweist (61). In Eukaryoten sind beide Proteine zu einer Polypeptidkette fusioniert (Cnx1 in Pflanzen; Gephyrin in Tieren). Die N-terminale Domäne von Cnx1 weist Homologien zu MoeA (E-Domäne) und die C-terminale Domäne zu MogA (G-Domäne) auf (65). Bei Gephyrin wurde eine umgekehrte Domänenanordnung gefunden (66). Hasona *et al.* konnten zeigen, dass der *moeA*-Phänotyp durch Zugabe von Sulfid und Molybdat im Medium aufgehoben werden konnte und postulieren eine Rolle von MoeA in der Aktivierung von Molybdat, unter Ausbildung einer noch unbekannten Thiomolybdat-Komponente (64). Aufgrund der Tatsache, dass *E. coli* *mogA*-Mutanten MPT bilden können (62), zusammen mit der erwiesenen Molybdat-Reparatur (63) wurde für MogA eine Mo-Insertions-Funktion postuliert (62). Es wird angenommen, dass beide Proteine zusammen in dem komplexen Reaktionsschritt der Mo Insertion eine essentielle Rolle spielen. Biochemische Untersuchungen von Cnx1 zeigten eine hohe Bindungsaffinität der G-Domäne zu MPT (65,67). Insgesamt werden für Cnx1 drei verschiedene Eigenschaften postuliert: MPT-Bindung, Molybdän-Insertion und Moco-Bindung (68,69). Durch die von Kuper *et al.* 2004 gelöste Cnx1-Kristallstruktur wurde gezeigt, dass vor der Molybdän-Inserierung ein Kupferatom über die Dithiolengruppe am MPT koordiniert ist, welches durch die Adenylierung der Cnx1G-Domäne als MPT-AMP vorliegt (101). Für die Cnx1E-Domäne wird postuliert, dass sie an der anschließenden Spaltung des MPT-Adenylats und der Inserierung des Molybdän-Atom involviert ist (102).

In Eubakterien wird anschließend der Moco durch das Anhängen eines Guanin-Nukleotids zu Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (MGD) modifiziert (71,72). Daran sind die Proteine MobA und MobB (*mob*-Operon) beteiligt. In der Literatur wird beschrieben, dass die Molybdän-Insertion vor der Dinukleotidbildung stattfindet (73). Als letztes wird durch die Bindung von zwei MGD an Molybdän das aktive Dinukleotid bis-MGD gebildet, über dessen Entstehung bislang noch keine detaillierten Angaben gemacht werden, jedoch sollte diese stark mit der Molybdän-Insertion assoziiert sein.

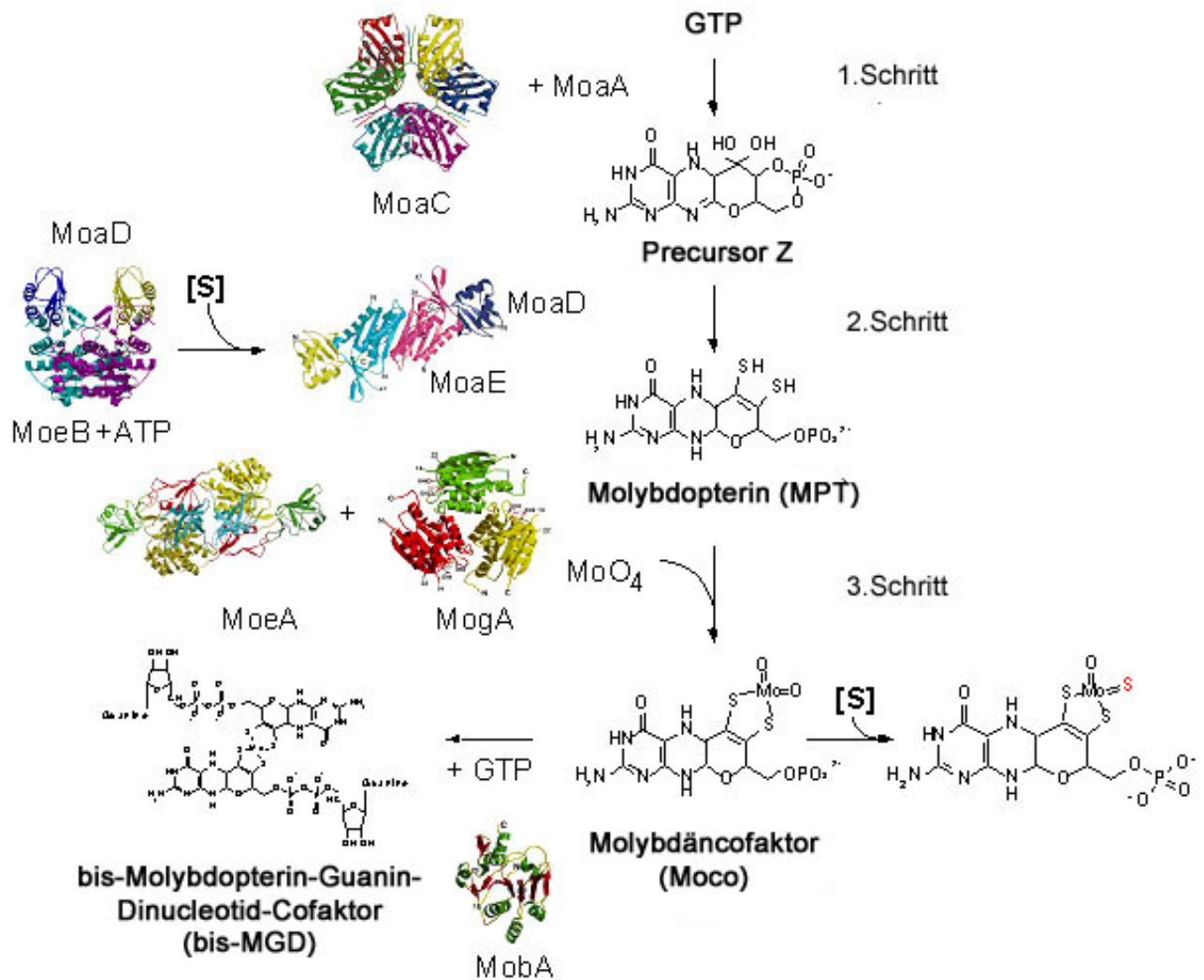


Abb.1.4 Modell der Biosynthese von Moco und bis-MGD in *E. coli*

Die Moco-Biosynthese lässt sich in drei Schritte unterteilen: (1) Precursor Z-Synthese aus GTP, (2) Konversion von Precursor Z zu MPT, (3) Molybdän-Insertion. In *E. coli* wird der Moco durch Anheftung von GMP zu MGD modifiziert. Durch anschließende Bindung von zwei MGD an Molybdän wird das aktive Dinukleotid bis-MGD gebildet. Die Proteinkristallstrukturen von MoaC, MoaD/E, MoeA, MogA und MobA konnten bislang gelöst werden.

1.8 Der Schwefeltransfer im zweiten Schritt der *E. coli* Moco-Biosynthese

Die gelöste Kristallstruktur der *E. coli* MPT-Synthase zeigte ein Heterotetramer, indem die zwei MoaE Untereinheiten ein zentrales Dimer bilden mit jeweils einer kleinen MoaD Untereinheit an jeder Außenseite (52). Dabei bindet der C-Terminus von MoaD in einer hochkonservierten Tasche von MoaE (Abb. 1.5).

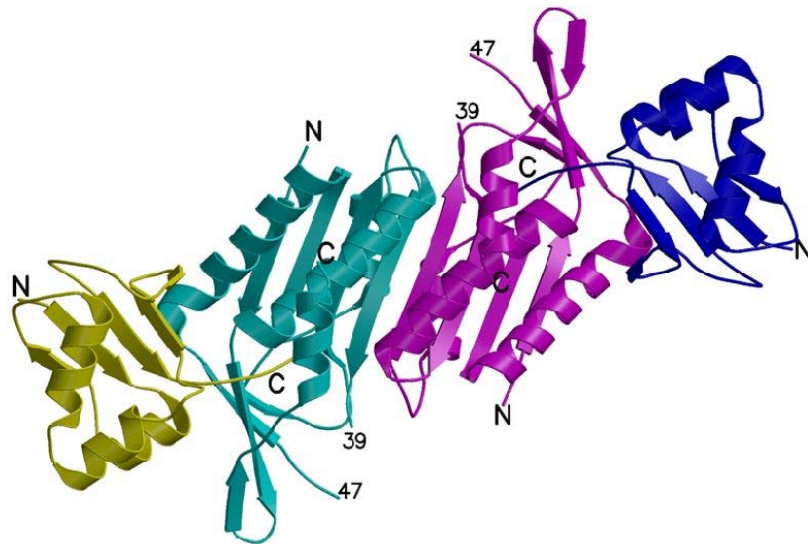


Abb. 1.5 Struktur der *E. coli* MPT-Synthase

Die von Rudolph *et al.* (52) gelöste MPT-Synthase Struktur zeigt zwei große zentrale MoaE Untereinheiten (türkis/magenta) an deren Außenseite jeweils eine kleine Untereinheit MoaD (gelb/blau) bindet. C und N beschreiben die Amino- und Carboxytermini der Proteine.

Die MPT-Synthase Struktur brachte die Frage auf, ob die Bindung des Dithiolenschwefels unabhängig an beiden aktiven Seiten stattfindet, oder ob ein hemisulfuriertes Intermediat von einer aktiven Seite zur anderen transportiert wird, um den zweiten Schwefel zu binden. Gutzke *et al.* (51) postulieren eine Kooperativität beider aktiven Zentren. Demnach soll nach der ersten Schwefelübertragung das zweite aktive Zentrum der MPT-Synthase durch einen Konformationswechsel eine größere Affinität zum Intermediat, dem sogenannten PrecursorG, erhalten. Nach dem zweiten Schwefeltransfer und der Konversion von PrecursorG zu MPT müssen beide MoaD Untereinheiten dissoziieren, um durch erneute Schwefelbeladung einen neuen Zyklus zu initiieren (Abb. 1.6)

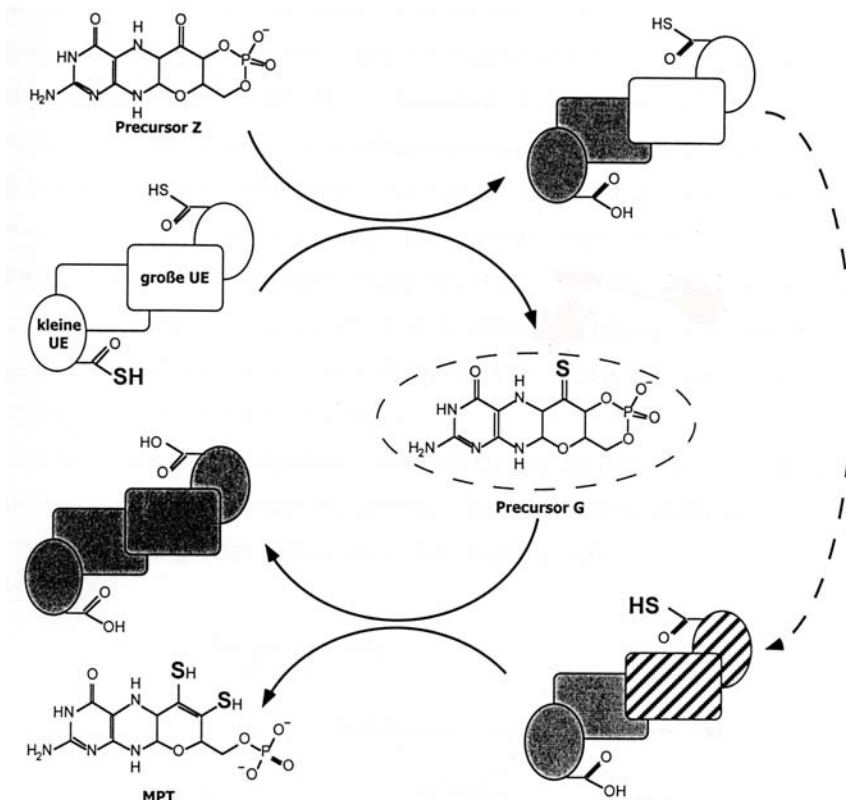


Abb. 1.6 Reaktionsmechanismus-Modell der Schwefelübertragung im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese nach Gutzke et al. (51)

Nach der ersten Schwefelübertragung reagiert das zweite aktive Zentrum der MPT-Synthase mit einem Konformationswechsel (schraffiert). Es erhält so eine größere Affinität zum Intermediat PrecursorG. Nach der zweiten Schwefelübertragung wird PrecursorG zu MPT konvertiert. Anschließend dissoziieren beide MocoD Untereinheiten, um erneut schwefel-beladen zu werden und einen neuen Zyklus initiieren zu können.

Wuebbens und Rajagopalan (103) zeigten, dass das hemisulfurierte Intermediat eng an die MPT-Synthase assoziiert ist. Demnach ist es wahrscheinlicher, dass jedes Precursor Z Molekül an einem einzigen aktivem Zentrum gebunden bleibt und durch den Austausch von carboxyliertem zu thiocarboxyliertem MocoD zu MPT konvertiert wird (Abb. 1.7).

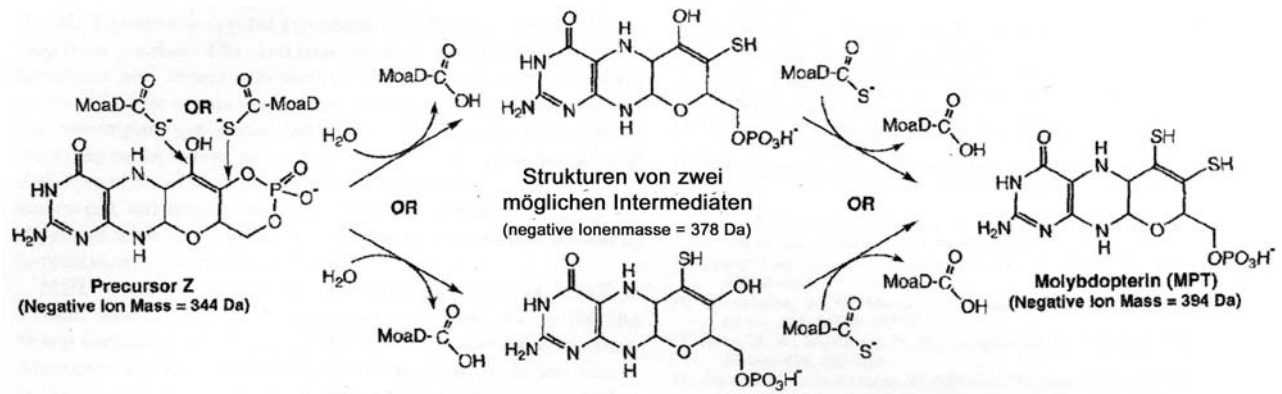


Abb. 1.7 Reaktionsmechanismus der Konversion von Precursor Z zu MPT nach Wuebbens und Rajagopalan (103)

In diesem hypothetischen Modell könnte das erste thiocarboxylierte MoaD die C1' oder C2' Position des Precursor Z angreifen, um eines der zwei dargestellten möglichen hemisulfurierten Intermediate zu bilden. Beide Reaktionen würden unter Verbrauch eines Wassermoleküls stattfinden. Das Intermediat bleibt an derselben Seite gebunden, bis es durch ein zweites thiocarboxyliertes MoaD zu MPT konvertiert ist.

Es wurde lange angenommen, das MoeB als MPT-Synthase-Sulfurase den Schwefel unter ATP-Verbrauch direkt auf MoaD überträgt (53). Aufgrund der hohen strukturellen Homologie von MoaD zu Ubiquitin (52) und MoeB zu dem eukaryotischen Ubiquitin-aktivierendem Enzym E1 (*Uba1*) (55) wurde später postuliert, dass eine Aktivierung der MPT-Synthase durch MoeB ähnlich abläuft wie der Ubiquitin-aktivierende Schritt der Degradation Ubiquitinmarkierter Proteine in Eukaryoten (104). Analog zu diesem Mechanismus wurde eine Thioesterbindung zwischen dem adenylierten MoaD-Carboxyterminus und einem der konservierten MoeB Cysteinresten postuliert (55). 2001 konnten der MoeB-MoaD Adenylatkomplex von Leimkühler *et al.* gereinigt und das Acyladenylates am C-Terminus von MoaD durch MoeB bestätigt werden (70). Allerdings konnte anhand von Mutationsstudien an MoeB-Cysteinresten eine Thioesterbindung zwischen MoeB und MoaD nicht bestätigt werden (70). Demnach stimmt die MoeB-MoaD Interaktion nur im ersten Schritt, der Aktivierung durch Adenylierung, mit der Ubiquitinaktivierung durch Uba1 ein. Etwas später gelang es Lake *et al.* die Adenylierung zu verifizieren, indem sie die Struktur des resultierenden MoeB-MoaD-Acyl-Adenylat Komplex aufklären konnten (56). Es handelt sich um ein Heterotetramer aus dimerem MoeB, mit jeweils einem gebundenem MoaD (Abb. 1.8 A). Die Bildung des Acyl-Adenylates findet am C-

terminalen G81 von MoeD statt, welches kovalent über ein Anhydrid am α -Phosphat gebunden ist (56) (Abb. 1.8 B,C). Daneben konnten konservierte Aminosäuren identifiziert werden, die an der Bindung von ATP und Mg^{2+} beteiligt sind.

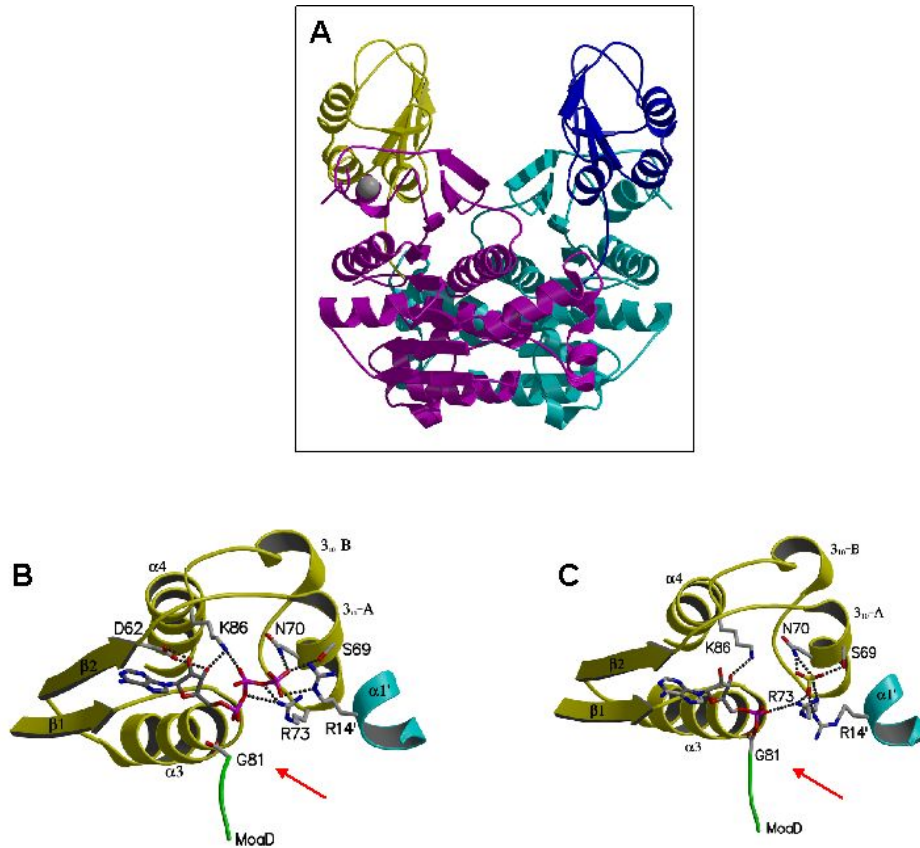


Abb. 1.8 Struktur des MoeB-MoeD Komplex und die Adenylierung von MoeD

(A) Das Ribbon-Diagramm zeigt den heterotetrameren MoeB-MoeD Komplex. Je ein MoeD (gelb/blau) bindet an ein MoeB (lila/türkis). Die Dimerisierung findet über die MoeB-Symmetrieachse statt. Ein gebundenes Zinkatom ist in grau gezeigt (das andere ist verdeckt). (B) Darstellung der Aminosäure G81 am C-Terminus von MoeD (roter Pfeil) mit ungebundenem ATP. (C) Ausbildung des Acyl-Adenylates über die kovalente Bindung des C-terminale G81 von MoeD an das α -Phosphat.

Da MoeB nicht direkt an der Thiocarboxylierung von MoeD involviert ist, muss ein zusätzliches Protein für die Sulfurierung der kleinen Untereinheit verantwortlich sein. Datenbankanalysen zeigten eine hohe Sequenzhomologie zwischen MoeB und ThiF, sowie MoeD und ThiS. ThiF ist für die Adenylierung von ThiS verantwortlich, einem ubiquitin-ähnlichem Protein mit einem C-terminalem Doppel-Glycin-Motiv. Zusätzlich konnten strukturelle Homologien zwischen ThiS und MoeD gezeigt werden (106). Die

Proteine ThiF und ThiS sind an der Schwefelübertragung auf einen Thiazol-Precursor in der prokaryotischen Thiaminbiosynthese beteiligt (105). ThiF ist für die Adenylierung von ThiS verantwortlich, welches anschließend durch das Rhodanese-ähnliche Protein Thil thiocarboxyliert wird. Dabei bindet die Sulfurtransferase IscS den aus L-Cystein mobilisierten Schwefel über eine Persulfidbindung, um diesen anschließend auf Thil zu übertragen (107). Neben der Thiaminbiosynthese sind Thil und IscS auch an der Schwefelübertragung in der 4-Thiouridinbiosynthese in *E. coli* beteiligt (107-109). Generell konnte für IscS (iron sulfur cluster synthesis proteinS) die Beteiligung an zahlreichen Schwefelaktivierungen in Prokaryoten wie z.B. für die Biosynthese von Eisen-Schwefelclustern (110,111) oder die Biosynthese aller Thionukleoside (112) gezeigt werden. IscS gehört mit CSD und CsdB zu den *E. coli* Cystein-Desulfurasen. Diese Proteine sind Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP)-abhängige Enzyme, die die Konversion von L-Cystein zu L-Alanin über eine Protein-gebundene Persulfidbindung am konservieren Cystein katalysieren (113). Sie werden auch als NifS-ähnliche Proteine bezeichnet, da sie in ihrer Aminosäuresequenz und katalytischen Eigenschaften dem *Azotobacter vinelandii* NifS Protein ähnlich sind, welches in der Eisen-Schwefel-Cluster Synthese der Nitrogenase involviert ist (114). Die Cystein Sulfinat Desulfinae CSD wird durch *csdA* codiert und wirkt auf Selenocystein, L-Cystein und L-Cystein Sulfinat (115). CsdB ähnelt eher einer Selenocystein Lyase, da es höhere Affinitäten zu L-Selenocystein als zu L-Cystein zeigt (116). CsdB oder auch SufS, wird vom *sufABCDSE* Operon codiert. 2003 konnte gezeigt, dass durch die Komplexierung von SufS mit SufE, die Affinität zu L-Cystein um das 50-fache gesteigert werden konnte (117,118). Es wird postuliert, dass der SufSE-Komplex den Schwefel für die Eisen-Schwefel-Cluster-Synthese mobilisiert und zu einem neuen Sulfurtransferase-Typ aus zwei verschiedenen Untereinheiten, gehört (117).

In vitro Analysen von IscS, CSD und CsdB hinsichtlich ihrer Relevanz in der bakteriellen Moco-Biosynthese ergaben, dass jede der drei *E. coli* Sulfurtransferasen unter ATP-Verbrauch und L-Cystein als Schwefelquelle die MPT-Synthase aktivieren kann (57). Untersuchungen einer *E. coli* *iscS*-Mutante zeigten allerdings, dass IscS *in vivo* nicht essentiell an der MPT-Synthese beteiligt ist (57).

Die in Eukaryoten identifizierten MoeB Homologen Cnx5 (in *A. thaliana*) und MOCS3 (in Menschen) besitzen N- und C-terminale Extensionen, wobei die C-Termini signifikante Homolgien zu Rhodanesen aufweisen. Rhodanesen gehören zu den

Sulfurtransferasen, die *in vitro* Schwefel von Thiosulfat auf Cyanid übertragen. Erst vor kurzem konnten Matthies *et al.* eine Rhodanese-Aktivität der C-terminalen Domäne für MOCS3 bestätigen, welche für die Thiocarboxylierung der kleinen humanen MPT-Synthase Untereinheit MOCS2A verantwortlich ist (58). Da auch einige bakterielle MoeB-homologen Proteine diese fusionierte Rhodanese-domäne besitzen, könnten Rhodanesen auch in Prokaryoten am zweiten Schritt der Moco-Biosynthese involviert sein, was bislang allerdings noch nicht gezeigt werden konnte.

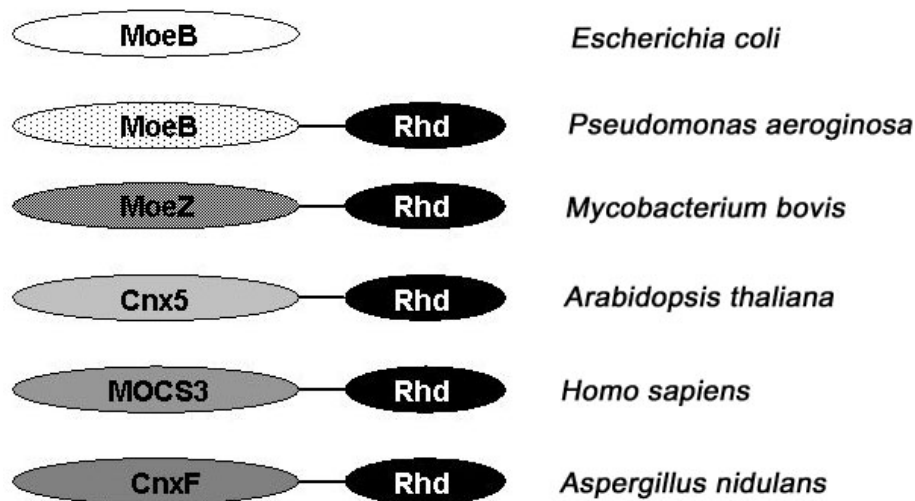


Abb.1.9 MoeB homologe Proteine in Pro- und Eukaryoten

Alle eukaryotischen, sowie einige prokaryotische MoeB-homologen Proteine besitzen eine zusätzliche C-terminal fusionierte Rhodanese-ähnliche Domäne (Rhd).

1.9 Die Familie der Rhodanesen

Sulfurtransferasen sind eine ubiquitär verbreitete Enzymklasse, die den Transfer eines Sulfan-Schwefels von einem Donormolekül auf einen thiophilen Akzeptor katalysieren (74,75). Als Rhodanesen werden seit 1933 sogenannte Thiosulfat:Cyanid Sulfurtransferasen (TSTs) bezeichnet, die *in vitro* die Übertragung eines Sulfan-Schwefel Atoms von Thiosulfat auf Cyanid katalysieren (78). 3-Mercaptopyruvat:Cyanid Sulfurtransferasen (MSTs) katalysieren die gleiche Reaktion, indem 3-Mercaptopyruvat als Schwefeldonor fungiert (76). Auf Aminosäure-Ebene sind MSTs und Rhodanesen zu 66 % identisch, was auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung hinweist (77). Die älteste und am besten

charakterisierte Sulfurtransferase ist die Rhodanese aus Rinder-Leber, die zahlreicher Rhodanese-Studien zugrunde liegt (z.B. 76,79,80).

Die katalytische Reaktion erfolgt über ein transientes Intermediat, in der das zu übertragende Schwefelatom als Persulfid an die Thiolgruppe des katalytischen Cystein der Rhodanese gebunden ist (Abb.1.6).

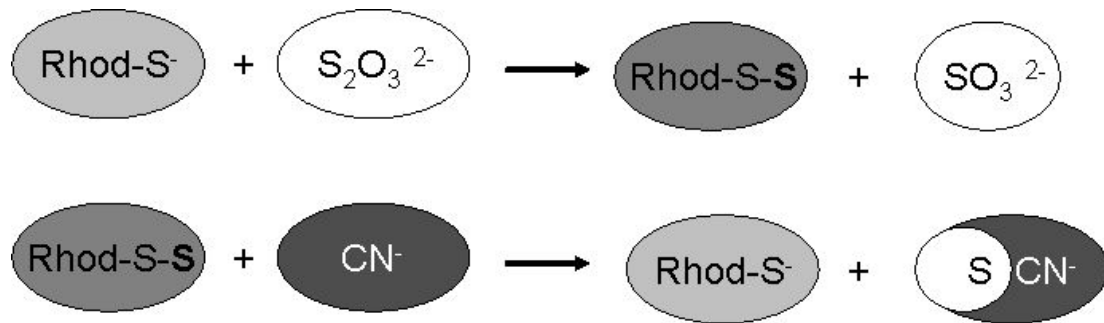


Abb.1.10 Der Schwefel-Transfer in der Rhodanese-katalysierten Reaktion

Rhodanesen katalysieren die Übertragung des Sulfan-Schwefels von Thiosulfat auf Cyanid. Dabei kommt es zu einem transienten Intermediat, in der das zu übertragende Schwefelatom als Persulfid am katalytischen Cystein gebunden wird.

Die Kristallstrukturen der *Bos taurus* Rhodanese und der *Azotobacter vinelandii* Rhodanese RhdA haben gezeigt, dass, obwohl ihre Sequenz nur zu 22 % identisch ist, sie eine sehr ähnlich dreidimensionale Struktur aufweisen (81,82). Beide Enzyme bestehen aus zwei identisch gefalteten (Rhodanese) Domänen, von der jede um die 120 Aminosäuren lang ist. Allerdings ist die Aminosäure-Homologie der Domänen zwischen RhdA und der *Bos taurus* Rhodanese überraschend niedrig (RhdA: 13 %; Rinder-Leber-Rhodanese: 21 %). Es hat sich gezeigt, dass nur die C-terminale Rhodanese-Domäne das katalytische Cystein besitzt. Dieses Cystein ist die erste von sechs Aminosäuren des „active-site-loops“, der die katalytische Tasche des Enzyms bildet. Neben den Tandem-Rhodanesen gibt es auch Proteine, die aus nur einer Rhodanese-Domäne bestehen. Zu ihnen gehört u.a. das GlpE, eine *E. coli* Thiosulfat:Cyanid Sulfurtransferase, deren biochemische und strukturelle Charakterisierung gezeigt hat, dass die inaktive N-terminale Domäne in TSTs und MSTs für die katalytische Enzymaktivität nicht essentiell ist (83,84).

Strukturanalysen der katalytischen Domäne von Cdc25A und Cdc25B, zwei am humanen Zellzyklus involvierte Cdc25 Phosphatasen, zeigten unerwartet die gleiche Faltungsstruktur mit dem katalytischen „active-site“ Cystein wie die Rhodanesen

(85,86). Der relevante Unterschied der beiden Enzyme liegt in der Länge des active-site loops, der bei den Rhodanesen aus sechs und bei den Cdc25-Phosphatasen aus sieben Aminosäuren gebildet wird. Da das Phosphatatom mit einem van der Waals-Radius von 1.9 Å geringfügig größer ist als das Schwefelatom (1.85 Å), kann es so besser in der katalytischen Tasche gebunden werden.

Obwohl Rhodanesen in Pflanzen, Tieren und Bakterien vorkommen, ist ihre biologische Funktion noch ungewiss, da noch kein *in vivo* Substrat für sie identifiziert werden konnte. Dass es sich dabei um eine der bislang getesteten unphysiologischen *in vitro* Reagenzien wie z.B. DTT und Cyanid handelt, ist auszuschließen (80,83). In der Diskussion möglicher Rhodanese-Funktionen stehen Cyanidentgiftung (87), Bildung prosthetischer Gruppen in Eisen-Schwefel-Cluster Proteinen (88) und Beteiligung am Schwefel-(89) und/oder Selen-Metabolismus (90,91). Die Beteiligung der Rhodanesen an unterschiedlichen biologischen Prozessen beruht vermutlich an der Variabilität der Aminosäuren des active-site-loops. Durch sie wird die individuelle Struktur der katalytischen Tasche definiert und die spezifische Substraterkennung und katalytische Aktivität bestimmt. Rhodanesen können neben der Einzel- und Tandemdomänen-Struktur auch an andere Proteindomänen fusioniert vorliegen (z.B. 85,92) oder aber auch an anderen Synthesewegen beteiligt sein, wie z.B. das Thil an der Thiamin- und Thiouridinbiosynthese (93). Anhand ihrer Aminosäuresequenz-Motive im active-site-loop teilten Bordo und Bork 2002 die Rhodanesen in unterschiedliche Modul-Klassen ein (99) (Abb.1.7).


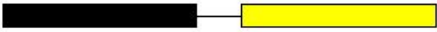




Module	Motive in der katalytischen Tasche
Thiosulfat:Cyanid Sulfurtransferasen (TST) 	CRXGX[R/T]
3-Mercaptopyruvat:Cyanid Sulfurtransferasen (MST) 	CG[S/T]GVT
ThiF 	C[R/K]XGX[R/D]
regulatorische Domäne Cdc25 Phosphatase 	CE[Y/F]SXXR
ThiI 	CX(M)GX(M)
YceA 	CXGGXR

Abb.1.11 Einteilung der Rhodanesen in Module nach Bordo & Bork (2002)

Die einzelnen Domänen sind farblich dargestellt. Katalytische Rhodanese-Domänen mit einem 6 Aminosäuren active site Motiv sind in gelb, die inaktiven Domänen in schwarz gezeigt. Rhodanese-Module mit 7 Aminosäuren in der katalytischen Tasche sind rot markiert. Andere Proteindomänen sind in grau dargestellt.

1.10 *E. coli* Rhodanesen

Anhand von sensitiven Homologie-Suchprogrammen wurden in pflanzlichen, tierischen und bakteriellen Genomen insgesamt 500 Gene identifiziert, die für Rhodanese-ähnliche Domänen codieren.

In *E. coli* sind insgesamt acht Rhodanese-ähnliche Proteine gefunden worden, die alle ein übereinstimmendes Sequenzmotiv von Cys-X-X-Gly in der active site besitzen (Abb. 1.9). Die drei Proteine, GlpE, PspE und YgaP bestehen nur aus einer Rhodanese-Domäne. Das 12 kDa große GlpE gehört zu dem *glp* Regulon, welches für den *sn*-Glycerol 3-Phosphat (Glycerol-P) Metabolismus verantwortlich ist. Anhand biochemischer *in vitro* Analysen konnte GlpE als Thiosulfat:Cyanid Sulfurtransferase charakterisiert werden, welche unter nativen Bedingungen als Dimer vorliegt (83). Die gelöste Kristallstruktur von GlpE zeigt hohe Homologien zu den katalytischen

Domänen von prokaryotischen und eukaryotischen Tandem-Domänen Rhodanesen und gilt als ubiquitäre Prototyp-Struktur für die einzelnen Rhodanese Domänen Module (84) (Abb.1.8).

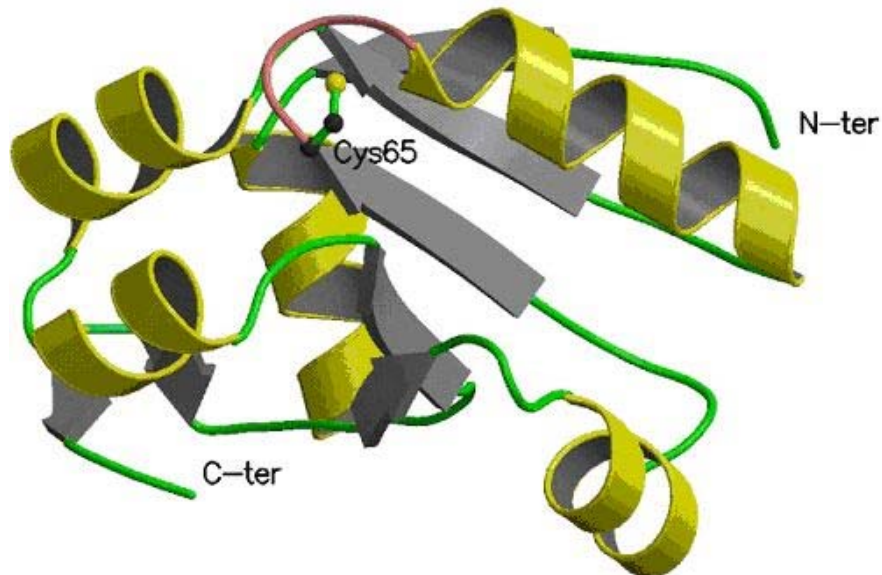


Abb.1.12 Struktur der *E. coli* Rhodanese GlpE

Die dreidimensionale Sekundärstruktur von GlpE gilt als Prototyp-Struktur der Rhodanese-domänen. Sie besteht aus 5 zentralen β -Faltblätter die von 5 α -Helices umrahmt werden. Der Loop aus sechs Aminosäuren mit dem katalytischen Cystein ist pink dargestellt. Die α -Helices sind gelb, die β -Faltblätter grau eingezeichnet.

PspE gehört zu den Proteinen des *psp* (phage-shock-protein) Operon, welches hauptsächlich in der Pathogenantwort auf Phageninfektion induziert wird (94). Es konnte ebenfalls als Thiosulfat:Cyanid Sulfurtransferase identifiziert werden (96), ist 11 kDa groß und besitzt eine N-terminale periplasmatische Signalsequenz (95).

Über YgaP ist bislang nur bekannt, dass es sich dabei um eine 18 kDa große Rhodanese mit einer C-terminalen Transmembranregion handelt, deren katalytisches Sequenzmotiv keiner anderen Rhodanese zugeordnet werden kann.

SseA und YnjE bestehen aus mehreren Rhodanese-Domänen, wobei die C-terminale Domäne das katalytische Cystein besitzt. SseA (31 kDa) wurde *in vitro* als erste prokaryotische 3-Mercaptopyruvat:Cyanid Sulfurtransferase identifiziert, dessen Kristallstruktur vor kurzem gelöst wurde (98). Über das 48 kDa große YnjE ist bislang noch nichts bekannt, genau wie über YceA das mit Thil und YbbB zu den Rhodanese

gehören, deren katalytische C-terminale Rhodanese-Domäne an andere Proteindomänen fusioniert sind.

Thil ist an der Schwefelübertragung in der Thiamin- und Thiouridin-Synthese beteiligt (93, 97), in der IscS als Schwefeldonor fungiert.

Bei der achten *E. coli* Rhodanese YbbB handelt es sich um eine erst kürzlich beschriebene Selenophosphat-abhängige tRNA 2-Selenouridin Synthase (91). In Abb.1.9 sind alle acht *E. coli* Rhodanesen in ihren Domänen dargestellt.

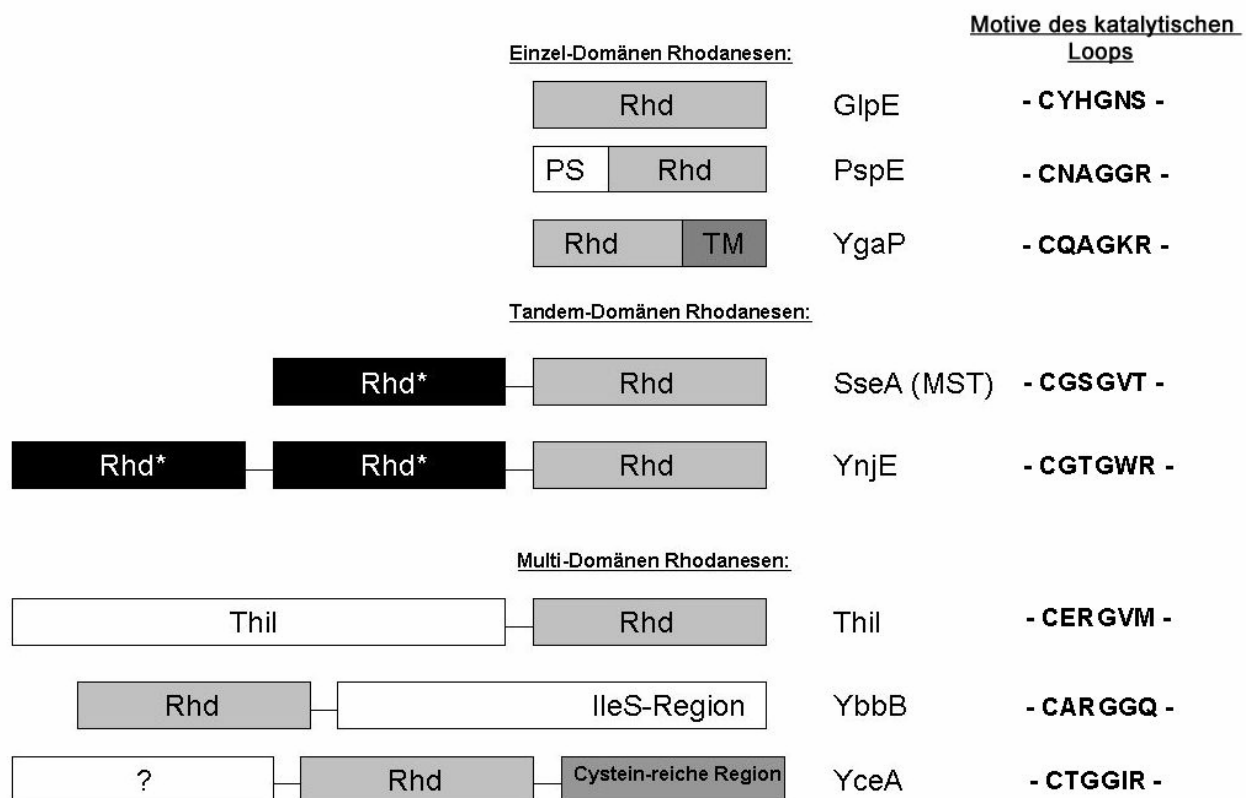


Abb.1.13 Übersicht der *E. coli* Rhodanesen

Die acht identifizierten *E. coli* Rhodanesen sind in ihren Rhodanese-Domänen dargestellt (Rhd). Inaktive Rhodanese-Domänen sind schwarz (RhdA*), andere Proteindomänen sind weiß gezeigt. PS, periplasmatische Signalsequenz; TM, Transmembranregion; IleS, Isoleucin tRNA Synthetase.

1.11 Ziel der Arbeit

Obwohl die Synthese des Molybdäncofaktors in *E. coli* bisher am besten untersucht ist, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden, wie der Schwefel für die Bildung der Dithiolengruppe am Moco mobilisiert wird. Voruntersuchungen zeigten, dass L-Cystein als Schwefelquelle fungiert, welches über eine unbekannte Sulfurtransferase auf die kleine Untereinheit der MPT-Synthase, MoaD, übertragen wird.

Schwerpunkt dieser Arbeit ist, anhand von Protein-Protein Interaktionen, diese spezifische *E. coli* Sulfurtransferase zu identifizieren und zu untersuchen.

Im Gegensatz zu Prokaryoten besitzen die eukaryotischen MoeB homologen Proteine, wie z.B. MOCS3 und Cnx5, C-terminale Rhodanese-ähnliche Fusionsdomänen. Aufgrund der Annahme, dass diese Rhodanese-ähnlichen Domänen in dem Schwefeltransfer des zweiten Schrittes der Moco-Biosynthese involviert sein könnten (58), soll überprüft werden, ob in *E. coli* unabhängige Rhodanesen mit MoeB interagieren und an der Sulfurierung beteiligt sind.

2. Ergebnisse

2.1 Analyse der Sulfitoxidase Aktivität in den *E. coli* *iscS*, *csdA*, *csdB* und *csdA/csdB* Mutantenstämmen

Leimkühler und Rajagopalan zeigten 2001, dass die NifS-ähnlichen *E. coli* Sulfurtransferasen IscS, CSD und CsdB, mit L-Cystein als Schwefelquelle, *in vitro* die inaktive MPT-Synthase sulfurieren können. Aufgrund der Tatsache, dass die in dem *E. coli* *iscS*-Mutantenstamm CL100(*iscS*⁻) (107) exprimierten Molybdoenzyme aktiv waren, wurde ausgeschlossen, dass IscS an der Moco-Biosynthese essentiell beteiligt ist (57).

Ob die *E. coli* Sulfurtransferasen CSD und/oder CsdB *in vivo* an der Schwefelübertragung und der Bildung von MPT beteiligt sind, sollte anhand von *E. coli* Mutantenstämmen in *csdA* und *csdB*, sowie einer *csdA/csdB* Doppelmutante untersucht werden. Um die MPT-Bildung in den Mutantenstämmen MC1061(*csdA*⁻), MC1061(*csdB*⁻) und MC1061(*csdA/csdB*⁻) zu überprüfen, wurde humane Sulfitoxidase in diesen Stämmen heterolog exprimiert, aufgereinigt und die Enzymaktivität analysiert. Die gemessenen Aktivitäten sind in Tab. 2.1 dargestellt.

Tab. 2.1 Analyse der Sulfitoxidase Aktivität von humaner Sulfitoxidase nach heterologer Expression in verschiedenen *E. coli* Sulfurtransferase-Mutantenstämmen

Stamm	Sulfitoxidase Aktivität in % *
MC1061	100
MC1061(<i>csdA</i> ⁻)	401,7
MC1061(<i>csdB</i> ⁻)	136,36
MC1061(<i>csdA/B</i> ⁻)	149,9
CL100(<i>iscS</i> ⁻)	3,05

* Sulfitoxidase Aktivität gemessen als Absorptionsänderung (ΔA) von 1 pro mg Protein

In allen *E. coli* Sulfurtransferase-Mutantenstämmen konnte aktive Sulfitoxidase detektiert werden. Die niedrigste Enzymaktivität wurde im CL100(*iscS*⁻) Stamm gemessen. Eine vollständig aktive Sulfitoxidase konnte nach Expression in den Stämmen MC1061(*csdA*⁻), MC1061(*csdB*⁻) und MC1061(*csdA/csdB*⁻) erhalten werden. Die Aktivitäten waren sogar höher als die der aufgereinigten Sulfitoxidase im korrespondierenden Wildtypstamm MC1061. Die niedrige Aktivität der gereinigten Sulfitoxidase aus dem CL100(*iscS*⁻) Stamm basierte auf einer verringerten MPT-Bildung, zurückzuführen auf die reduzierten Aktivität von MoaA, einem Eisen-Schwefel-Cluster-haltigen Protein, das die Umwandlung von GTP zu Precursor Z katalysiert (43).

Die Analyse bestätigte, dass keine der L-Cystein Desulfurasen, IscS, CSD und CsdB, als spezifische Sulfurtransferase *in vivo* in der Moco-Biosynthese beteiligt ist.

2.2 Charakterisierung von Rhodanese-ähnlichen Proteinen in *E. coli*

Da gezeigt werden konnte, dass in der humanen Moco-Biosynthese die Rhodanese-Domäne von MOCS3 für die Schwefelübertragung auf die kleine Untereinheit MOCS2A verantwortlich ist (58) und das *E. coli* MoeB Protein diese Rhodanese-domäne nicht besitzt, sollte untersucht werden, ob in *E. coli* ein separates Rhodanese-ähnliches Protein spezifisch die Thiocarboxylierung von MoaD katalysiert.

Aufgrund dessen wurden zunächst die *E. coli* Rhodanesen Thil und GlpE, sowie die *Bos taurus* Rhodanese auf eine mögliche Beteiligung am Schwefeltransfer und der Konversion von Precursor Z zu MPT in *E. coli* überprüft.

2.2.1 Aufreinigung der *E. coli* Rhodanesen Thil und GlpE

GlpE ist eine cytoplasmatische 12 kDa Thiosulfat:Cyanid Sulfurtransferase und gehört zu der Gruppe der *E. coli* Einzeldomänen Rhodanesen. Das 54 kDa große Thil dagegen besitzt eine Proteinfusionierte C-terminale katalytische Rhodanese-domäne und ist an der Thiamin- und Thiouridinsynthese beteiligt. Die Nukleotidsequenz von GlpE wurde mittels PCR aus genomischer *E. coli* DNA amplifiziert und an einen N-terminalen His-Tag fusioniert. Thil lag bereits kloniert im Vektor pET15b vor (pSL223), resultierend in einer N-terminalen His-Tag Fusion für

das gereinigte Protein. Die aufgereinigten Proteine sind in Abb. 2.1 und 2.2 im SDS-PAGE dargestellt.

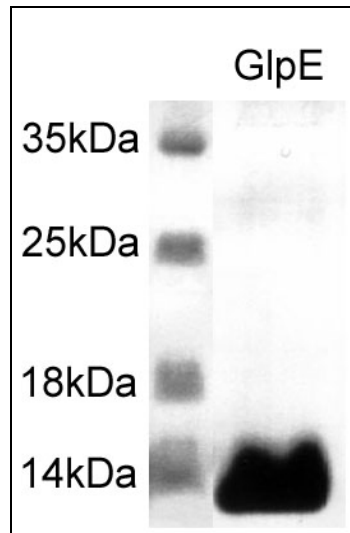
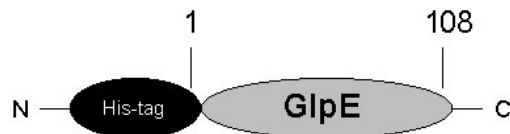


Abb. 2.1 Aufreinigung der *E. coli* Rhodanese GlpE

Die 15%ige SDS-PAGE zeigt das chromatographisch über Ni-NTA aufgereinigte 14 kDa große GlpE (+ His-Tag).

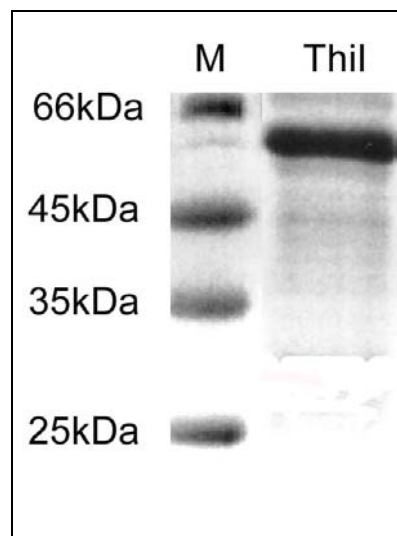
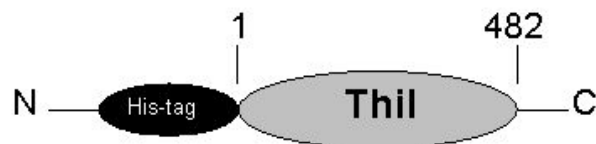


Abb.2.2 Aufreinigung von Thil aus *E. coli*

Nach der Ni-NTA Chromatographie konnte das aufgereinigte 54 kDa *E. coli* Thil im 15% SDS-PAGE detektiert werden.

2.2.2 *In vitro* Aktivierung der inaktiven MPT-Synthase durch die Thiosulfat: Cyanid Sulfurtransferasen Thil, GlpE und die *Bos taurus*-Rhodanese

Die beiden Rhodanese-ähnlichen Proteine aus *E. coli* Thil und GlpE, sowie die *Bos taurus*-Rhodanese sollten auf MPT-Bildung getestet werden. Dazu sind jeweils eine der Rhodanesen mit MoeB, inaktiver MPT-Synthase, Precursor Z, MgATP und Thiosulfat als Schwefelquelle inkubiert worden. Um die produzierte MPT-Menge in diesem System zu bestimmen, wurde MPT in das fluoreszierende Oxidationsprodukt, Form A, durch saures I_2/KI , umgewandelt. Form A ist anschließend an einer C18 HPLC Säule chromatographisch quantifiziert worden (25). Die HPLC Elutionsprofile in Abb. 2.3 zeigten, dass die *E. coli* Rhodanese-ähnlichen Proteine GlpE und Thil, sowie die *Bos taurus*-Rhodanese in der Lage waren, mit Thiosulfat als Schwefeldonor, die inaktive MPT-Synthase *in vitro* zu aktivieren. Die verschiedenen Form A-Peakhöhen können durch unterschiedliche Umsetzungsgeschwindigkeiten der Rhodanesen von Precursor Z zu MPT erklärt werden.

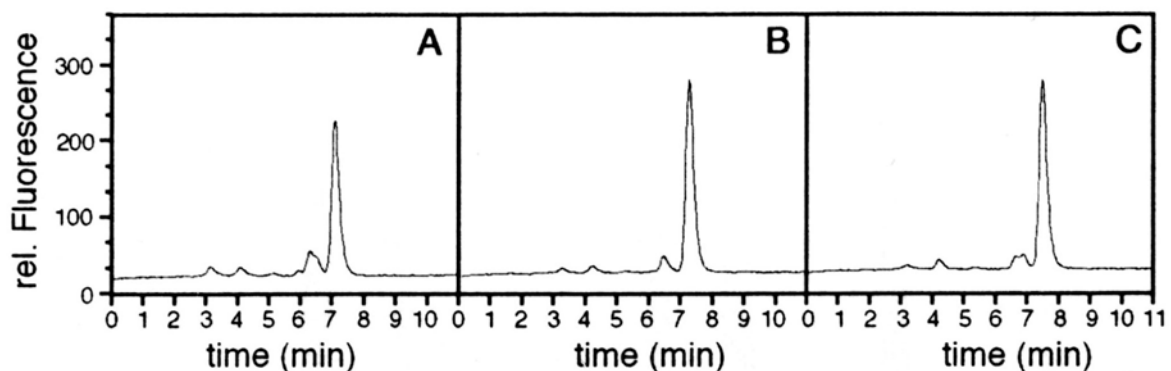


Abb. 2.3 FormA Analyse nach der Aktivierung der inaktiven MPT-Synthase durch die Rhodanese-ähnlichen Proteine GlpE, Thil und die *Bos taurus*-Rhodanese

5,4 μ M inaktive MPT-Synthase, 3,5 μ M MoeB, 2,5mM MgATP, 2,8 nM Precursor Z, 250 μ M Thiosulfat sind mit 5 μ M (A) *Bos taurus*-Rhodanese (B) GlpE und (C) Thil inkubiert worden. Das gebildete MPT wurde in sein fluoreszierendes Oxidationsprodukt Form A umgewandelt und an einer C18 HPLC Säule gemessen. Form A eluiert bei ca. 7 Minuten.

Es konnte bestätigt werden, dass neben den L-Cystein Sulfurtransferasen IscS, CSD und CsdB auch die Rhodanese-ähnliche Proteine GlpE, Thil und die *Bos taurus*-Rhodanese *in vitro* den Schwefel auf die MPT-Synthase übertragen und diese

thiocarboxylieren können. Um weitere *in vivo* Studien durchzuführen und den möglichen physiologischen Schwefelüberträger zu identifizieren, wurden zusätzlich die *E. coli* Rhodanesen YceA, SseA, PspE und YgaP kloniert, exprimiert und aufgereinigt.

2.2.3 Reinigung von SseA und YceA, zwei Rhodanese-ähnliche Proteine mit einer zusätzlichen Protein-Domäne

SseA ist erstmals von Hama *et al.* (1994) beschrieben und von Colnaghi *et al.* (2001) als 3-Mercaptopyruvat:Cyanid Sulfurtransferase identifiziert worden (134,135). Es handelt sich dabei um ein aus zwei Domänen bestehendes, 31 kDa Protein.

Über das 40 kDa große YceA ist bislang nichts bekannt, jedoch soll auch hier die Rhodanesedomäne an ein (noch unbekanntes) Protein fusioniert sein.

Die Expression von SseA erfolgte wie in Ref. 135 beschrieben, jedoch konnte kein Protein aufgereinigt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Nukleotidsequenz von *yceA* wurde an einen N-terminalen His-tag im pet15b Vektor fusioniert, allerdings war eine Proteinaufreinigung nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

2.2.4 Die *E. coli* Einzeldomänen-Rhodanesen YgaP und PspE

PspE und YgaP gehören, wie GlpE, zu den Einzeldomänen Rhodanesen in *E. coli*. PspE ist ebenfalls eine Thiosulfat:Cyanid Sulfurtransferase, 11 kDa groß und besitzt eine N-terminale periplasmatische Signalsequenz (Abb.2.4, blau).

Über YgaP ist bislang nur bekannt, dass es sich dabei um eine 18 kDa große Rhodanese mit einer C-terminalen Transmembranregion (Abb.2.4, rot) handelt, deren „active site loop“ Motiv keiner anderen *E. coli* Rhodanese zugeordnet werden kann.

1	M	D	Q	F	E	C	I	N	V	A	D	A	H	Q	K	L	Q	E	K	E	GlpE-E.coli
1	M	F	K	K	G	L	L	A	L	A	L	V	F	S	L	P	V	F	A	A	PspE-E.coli
1	-	M	A	L	T	T	I	S	P	H	D	A	Q	E	L	I	A	R	G	-	YgaP-E.coli
21	A	V	L	V	D	I	R	D	P	Q	S	F	A	M	G	H	A	V	Q	A	GlpE-E.coli
21	E	H	W	I	D	V	R	V	P	E	Q	Y	Q	Q	E	H	V	Q	G	A	PspE-E.coli
19	A	K	L	I	D	I	R	D	A	D	E	Y	L	R	E	H	I	P	E	A	YgaP-E.coli
41	F	H	L	T	N	D	T	L	G	A	F	M	R	D	-	-	N	D	F	D	GlpE-E.coli
41	I	N	I	P	L	K	E	V	K	E	R	I	A	T	A	V	P	D	K	N	PspE-E.coli
39	D	L	A	P	L	S	V	L	E	Q	S	G	L	P	-	A	K	L	R	H	YgaP-E.coli
59	T	P	V	M	V	M	C	Y	H	G	N	S	S	K	G	-	-	-	-	-	GlpE-E.coli
61	D	T	V	K	V	Y	C	N	A	G	R	Q	S	G	Q	-	-	-	-	-	PspE-E.coli
58	E	Q	I	I	F	H	C	Q	A	G	K	R	T	S	N	N	A	D	K	L	YgaP-E.coli
74	-	-	-	-	-	-	A	A	Q	Y	L	L	Q	Q	G	Y	D	-	-	-	GlpE-E.coli
76	-	-	-	-	-	-	A	K	E	I	L	S	E	M	G	Y	T	-	-	-	PspE-E.coli
78	A	A	I	A	A	P	A	E	I	F	L	L	E	D	G	I	D	G	W	K	YgaP-E.coli
85	-	-	-	-	-	-	V	V	Y	S	I	D	G	G	F	E	A	W	Q	R	GlpE-E.coli
87	-	-	-	-	-	-	H	V	E	N	A	G	G	-	-	-	-	-	L	K	PspE-E.coli
98	K	A	G	L	P	V	A	V	N	K	S	Q	P	L	P	L	M	R	Q	V	YgaP-E.coli
99	Q	F	P	A	E	-	-	-	-	-	V	A	Y	G	A	-	-	-	-	-	GlpE-E.coli
96	D	I	A	M	P	-	-	-	-	-	K	V	K	G	-	-	-	-	-	-	PspE-E.coli
118	Q	I	A	A	G	G	L	I	L	I	G	V	V	L	G	Y	T	V	N	S	YgaP-E.coli
108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GlpE-E.coli
104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PspE-E.coli
138	G	F	F	L	L	S	G	F	V	G	A	G	L	L	F	A	G	I	S	G	YgaP-E.coli
108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GlpE-E.coli
104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	PspE-E.coli
158	F	C	G	M	A	R	L	L	D	K	M	P	W	N	Q	R	A	-	-	-	YgaP-E.coli

Abb. 2.4 Sequenzalignment von GlpE, YgaP und PspE

Das Alignment zeigt die Sequenzen von GlpE, PspE und YgaP im Vergleich. Die Transmembrandomäne von YgaP ist rot, das periplasmatische Signalpeptid von PspE ist blau markiert.

2.2.4.1 Klonierung und Expression von PspE(R) und YgaP(R)

Die DNA-Sequenzen der drei Rhodanesen wurden durch spezifische Primer mittels PCR aus genomischer *E. coli* DNA amplifiziert und an einen N-terminalen His-Tag fusioniert.

Von PspE und YgaP gab es jeweils, neben der gesamten Proteinsequenz, noch eine weitere Protein-Variante; bei PspER wurde die N-terminale periplasmatische Signalsequenz (21 Aminosäuren) und bei YgaPR die C-terminale Transmembran Region (59 Aminosäuren) deletiert.

Nach Expression im *E. coli* BL21-Stamm erfolgte die Aufreinigung mittels Ni-NTA Chromatographie. Eine Aufreinigung von YgaPR war nur ohne C-terminale

Transmembran-Domäne möglich (Abb.2.5). Auch durch Zugabe von Triton-X100 konnte keine Aufreinigung von YgaP erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Durch den fusionierten His-Tag hatte YgaPR eine Proteingröße von 14 kDa.

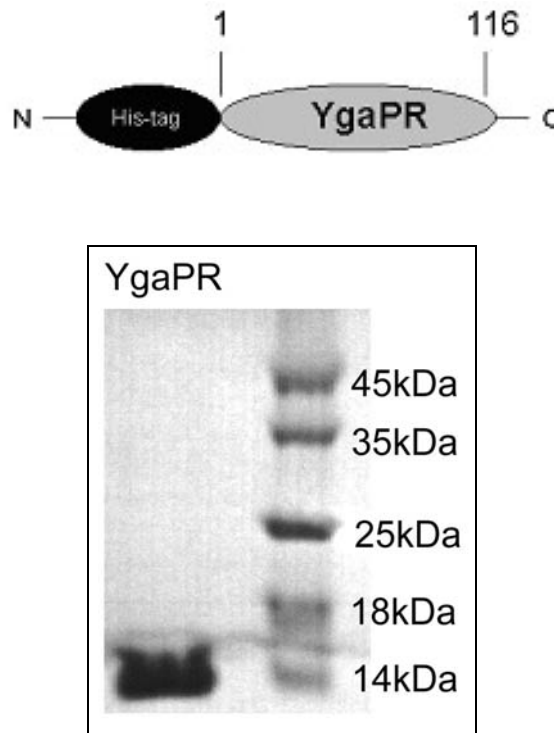


Abb. 2.5 Aufreinigung von YgaPR mittels Ni-NTA Chromatographie

Die Elutionsfraktionen im 15%igen SDS-Gel zeigen die Ni-NTA-Chromatographie Aufreinigung von YgaPR (+ His-Tag: 14 kDa). Eine YgaP Expression war nicht möglich.

PspER konnte nur ohne periplasmatische Domäne erfolgreich exprimiert und aufgereinigt werden (Abb.2.6). Zusammen mit dem N-terminalen His-Tag besaß das Protein eine Größe von 11 kDa. Es ist anzumerken, dass wie in der Literatur beschrieben, bislang PspE nur ohne periplasmatische Domäne aufgereinigt werden konnte (96).

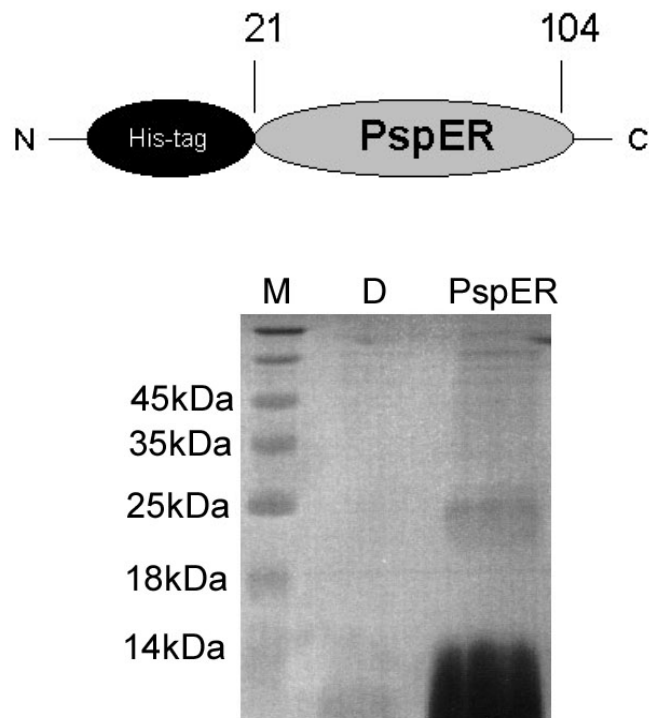


Abb. 2.6 **Aufreinigung von PspER über den N-terminalen His-Tag**

Im 15%igen SDS-PAGE konnte PspER (+ His-Tag) mit einer Größe von 11 kDa detektiert werden. Eine Expression und Aufreinigung von PspE konnte nicht erzielt werden (Daten nicht gezeigt). *M*, Marker; *D*, Proteindurchbruch

2.2.5 Molekulargewichtsbestimmung von YgaPR, PspER und GlpE

Das Molekulargewicht der Proteine YgaPR und PspER sollte durch analytische Gelfiltration ermittelt werden.

Je 5 nmol gereinigtes Protein sind auf eine Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetragen worden. Die Elutionsprofile und -volumen sind in Abb. 2.7 dargestellt. PspER eluierte bei einem Volumen von 17,34 ml, was der molekularen Größe eines Monomers (11 kDa) entsprach.

Das YgaPR in Lösung als Monomer vorlag, konnte anhand des Elutionsvolumen von 16,72 ml und dem daraus errechneten Molekulargewicht von 14 kDa ermittelt werden.

GlpE zeigte durch analytische Gelfiltration ermitteltes Molekulargewicht von 9 kDa. Dies steht im Widerspruch mit der tatsächlichen Proteingröße (+ His-Tag = 14 kDa) und der Tatsache das GlpE unter nativen Bedingungen als Dimer beschrieben wurde (83).

Dieses unterschiedliche Laufverhalten in Gelfiltrationsanalysen konnte auch bei anderen Rhodanesen beobachtet werden. So wurde z.B. für die *Azotobacter vinelandii* Rhodanese RhdA gezeigt, dass das Protein je nach unterschiedlichen Expressionen entweder als Monomer oder, durch kovalente Bindung, als Dimer vorliegen kann (S. Pagani, persönliche Mitteilung). Ein weiterer Grund für das veränderte Elutionsvolumen von GlpE kann auch die globuläre Proteinstruktur sein (83).

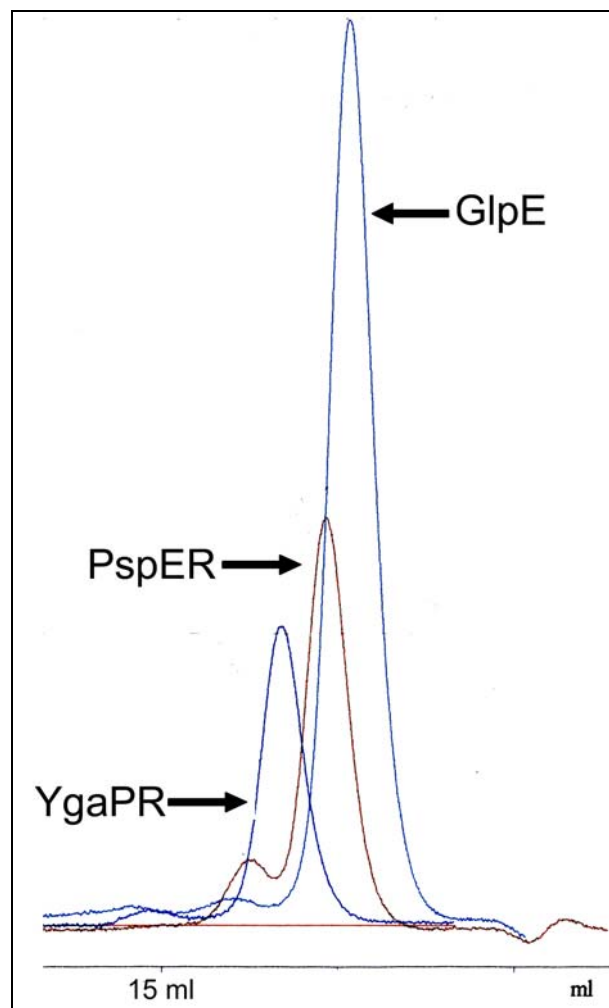


Abb. 2.7 Gelfiltration von YgaPR, PspER und GlpE

Mittels einer analytischen Superdex 200 Gelfiltrationssäule wurden je 5 nmol YgaPR, GlpE und PspER chromatographisch nach ihrer Größe aufgetrennt. PspER zeigt eine errechnete Größe von 11 kDa und YgaPR von 14 kDa, d.h. beide liegen als Monomer vor. GlpE dagegen zeigt eine Größe von 9 kDa.

2.2.6 Analyse der Sulfurtransferase-Aktivität von YgaPR

Um die Sulfurtransferase-Aktivität von YgaPR zu bestimmen, wurde gereinigtes Protein in zwei verschiedene Analysearten mit unterschiedlichen Schwefelakzeptoren eingesetzt.

Im Sörbos-Assay (130) wirkt Cyanid als Schwefelakzeptor, das durch eine aktive Rhodanese zu Thiocyanat umgewandelt wird. Durch Zugabe eines Eisen-Nitrat-haltigen Reagenz (Sörbos-Reagenz) bildet Cyanid einen Thiocyanid-Eisen-Komplex der bei OD_{460nm} quantifiziert werden kann.

Im Gegensatz dazu, fungiert im DTT-Assay (136) das DTT als Schwefelakzeptor. Wird das reduzierte DTT durch eine Sulfurtransferase persulfuriert, zerfällt dies zu H₂S und oxidiertem DTT. Letzteres wird anschließend photometrisch bei 285 nm nachgewiesen.

Somit wurde die *in vitro* Sulfurtransferase-Aktivität von YgaP anhand von zwei unterschiedlichen Schwefelakzeptoren getestet und diese miteinander verglichen.

Mit Thiosulfat als Schwefelquelle und Cyanid als Schwefelakzeptor konnte für YgaPR eine spezifische Aktivität von 6 U/mg ermittelt werden. Keine Aktivitäten zeigten Ansätze mit 3-Mercaptopyruvat als Schwefeldonor (Tab.2.2).

Um auszuschließen das die, im Vergleich zu GlpE (800 U/mg (83)) und PspER (270 U/mg (98)), geringe spezifische Aktivität von YgaPR durch Cyanid als unphysiologischer Schwefelakzeptor hervorgerufen wird, wurden die Werte mit dem DTT-Assay verglichen. Die gemessenen Aktivitäten von GlpE und PspER, sind in Tab. 2.3 dargestellt. Mit 8,2 U/mg lag die Aktivität von YgaPR nur um 2,2 U/mg höher als im Sörbos-Assay. Die Werte von GlpE und PspER im DTT-Assay lagen dagegen weit unter denen des Sörbos-Assay, was zeigen könnte, das Cyanid nicht der physiologische Schwefelakzeptor ist.

Tab. 2.2 Berechnung der spezifische Aktivitäten im Sörbos-Assay

		<u>spezifische Aktivität (U/mg)</u>
YgaPR	Thiosulfat:KCN	6
	3-Mercaptopyruvat:KCN	n.d.
GlpE	Thiosulfat:KCN	800
PspER	Thiosulfat:KCN	270

n.d. nicht detektierbar

Tab. 2.3 Berechnung der spezifische Aktivitäten im DTT-Assay

		spezifische Aktivität (U/mg)
YgaPR	Thiosulfat:DTT	8,2
GlpE	Thiosulfat:DTT	87,58
PspER	Thiosulfat:DTT	60,59

2.2.6.1 K_m Wertbestimmung für YgaPR

Anhand der gemessenen Daten wurde der K_m -Wert für YgaPR bestimmt. In Abb. 2.8 und 2.9 sind die Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk Diagramme dargestellt. Der K_m Wert für Thiosulfat konnte als 18,1 mM und für KCN als 1,86 mM bestimmt werden. V_{max} konnte als 12 U/mg bestimmt werden.

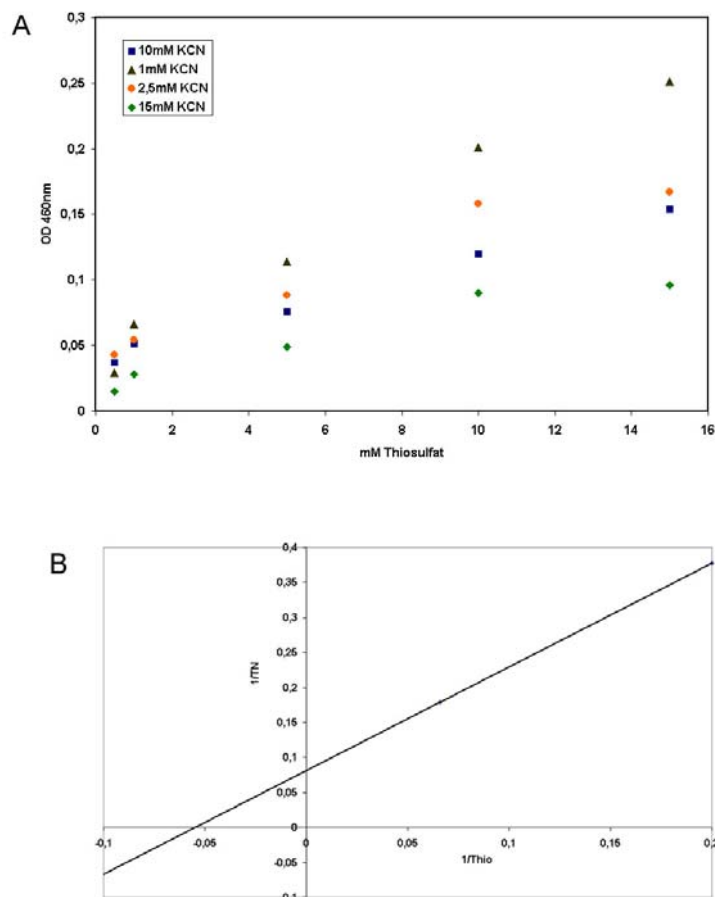
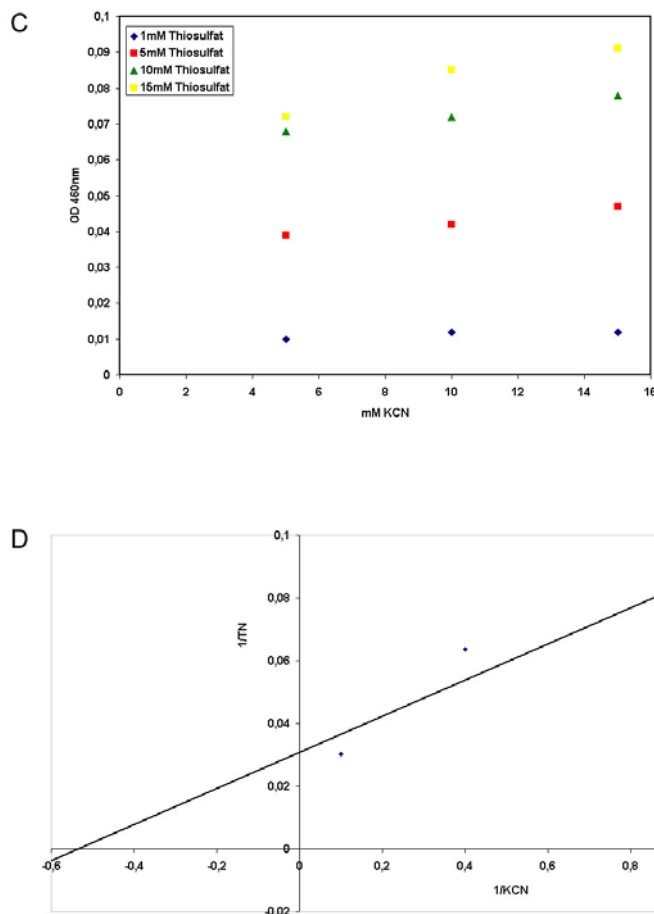


Abb. 2.8
Sulfurtransferase-
aktivität von YgaPR

(A) Michaelis-Menten-Darstellung. 1,2 μ M YgaP wurde mit konstanter Thiosulfat- und variierender Cyanidkonzentration inkubiert und die Thiocyanat-Komplexbildung bei OD_{460nm} gemessen. Je mehr Cyanid im Ansatz war, desto weniger Thiocyanat wurde gebildet. (B) Lineweaver-Burk Darstellung. Die „turnover number“ (TN) ist in $\text{min} \cdot (\text{mM Thio}^{-1})^{-1}$ angegeben. Der K_m Wert für Thiosulfat beträgt 18,1 mM.

**Abb. 2.9**

Sulfurtransferaseaktivität von YgaPR

(C) Michaelis-Menten-Darstellung. 1,2 μM YgaP wurde mit konstanter Cyanid- und variierender Thiosulfatkonzentration inkubiert und die Thiocyanat-Komplexbildung bei $\text{OD}_{460\text{nm}}$ gemessen. Je mehr Cyanid im Ansatz war, desto weniger Thiocyanat wurde gebildet.

(D) Lineweaver-Burk Darstellung. Die „turnover number“ (TN) ist in $\text{min} \cdot (\text{mM SCN}^{-1})^{-1}$ angegeben. Der K_m Wert für Cyanid beträgt 1,86 mM.

2.2.7 Analyse der Persulfidbindung durch Fluoreszenz-Quenching

Die intrinsische Fluoreszenz von Rhodanesen kann verändert werden, wenn es zu einer stabilen Persulfidbindung an dem Protein kommt. Diese Veränderung beruht auf dem Energietransfer zwischen der Persulfidbindung und den Tryptophanresten im Protein (137,138). In der Aminosäuresequenz von GlpE, PspER und YgaPR ist jeweils ein Tryptophan zu finden. Die Anregungswellenlänge betrug bei YgaPR 280 nm und bei GlpE bzw. PspER 295 nm. Die Emission wurde im Bereich von 300 – 400 nm bestimmt. Das Emissionsmaximum lag für GlpE und YgaPR bei 330 nm und für PspER bei 340 nm.

Die Abb. 2.10 bis 2.12 stellen die gemessenen Emissionen dar. Die blaue Linie beschreibt das Protein in seiner aufgereinigten unbehandelten Form. Durch Cyanidzugabe (20 μM) wurde die Rhodanese (10 μM) vollständig entladen, was durch die Zunahme der Emission bei GlpE und PspER im Spektrum beobachtet werden konnte (Abb. 2.10 - 2.12, rot) YgaPR zeigte keine Emissionsänderung nach

Cyanidinkubation (Abb. 2.10 - 2.12, grün) und lag demnach in Schwefel-entladener Form vor. Anschließend wurde die Persulfidbindung am katalytischen Cystein des Proteins durch Zusatz von Thiosulfat (100 μM) wiederhergestellt. Diese Bindung bewirkte ein sogenanntes Löschen (quenching) der Fluoreszenz (Abb.2.10; 2.11 grün; Abb. 2.12, rot).

Die Persulfurierungsrate der aufgereinigten Rhodanesen wurde ermittelt, indem das Verhältnis zwischen dem Cyanid- (0%) und dem Thiosulfat-Ansatz (100%) bestimmt wurde. Dadurch konnte bestimmt werden, dass GlpE zu 40,25%, PspER zu 38,9% und YgaPR zu 10% aus *E. coli* gereinigt werden konnte.

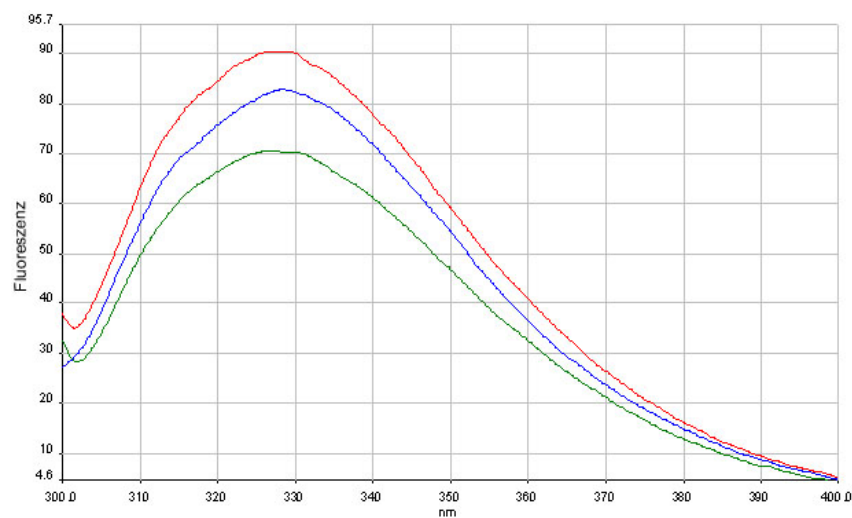


Abb. 2.10 Fluoreszenzspektren von GlpE

Das Emissionspektrum ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$) von GlpE (10 μM) zeigt das unbehandelte (blau), entladene (rot) und durch Thiosulfat schwefelbeladene (grün) Protein. Das aufgereinigte GlpE lag zu 40,25% persulfuriert vor.

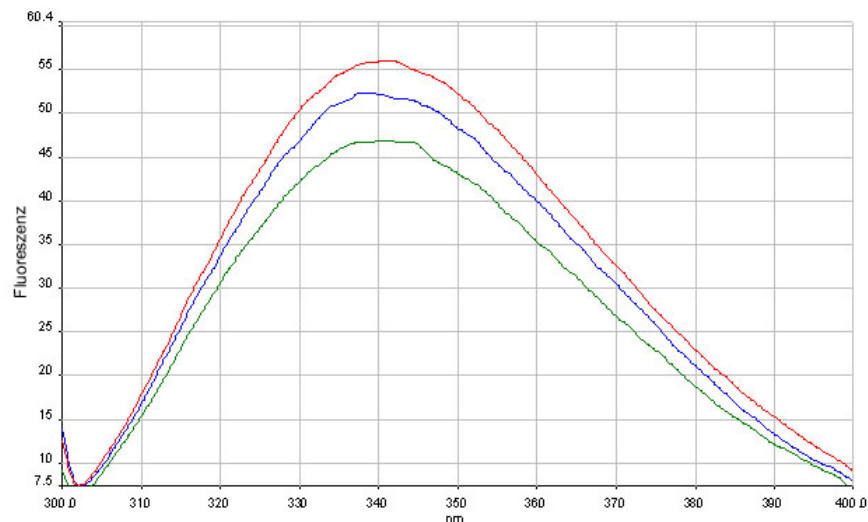


Abb. 2.11 Emissionsspektrum von PspER

Die Veränderung der intrinsischen Fluoreszenz ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$) von PspER ($10 \mu\text{M}$) wurde anhand der Emission bei 300-400 nm untersucht. Durch Vergleich von unbehandeltem (blau) und Cyanid-inkubiertem Protein (rot) konnte ein Fluoreszenz-Quenching durch Zugabe von Thiosulfat (grün) detektiert werden. Der errechnete Persulfurierungslevel von PspER lag bei 38,9%.

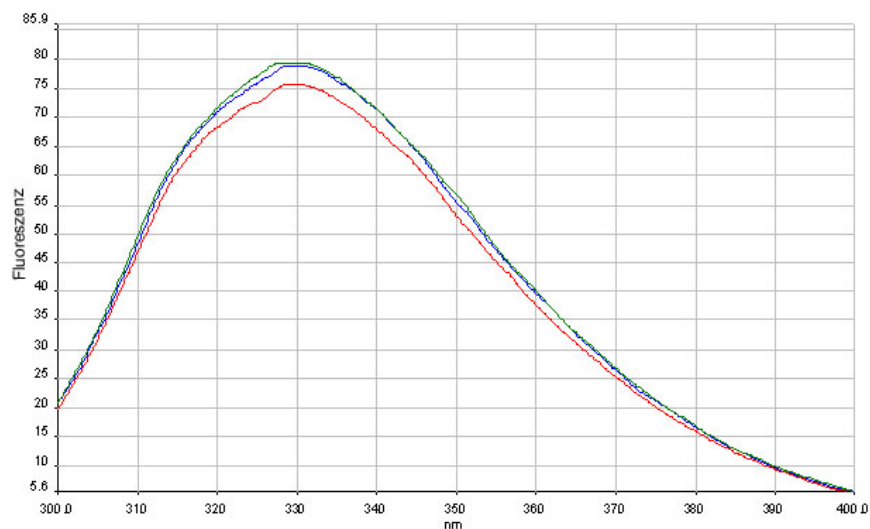


Abb. 2.12 Fluoreszenzspektrum von YgaPR

Zwischen unbehandeltem (blau) und Cyanid-inkubiertem (grün) YgaPR ($10 \mu\text{M}$) konnte im Emissionsspektrum ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) keine Veränderung beobachtet werden. Die Zugabe von Thiosulfat löste eine Fluoreszenz-Löschung aus (rot), was einer Persulfurierungsrate des gereinigten YgaPR von 10% entspricht.

2.2.8 Sekundärstruktur-Analyse der *E. coli* Einzeldomänen-Rhodanesen GlpE, PspER und YgaPR durch CD-Spektroskopie

Die Analyse der Sekundärstruktur durch Circulare Dichroismus (CD) Spektroskopie sollte zeigen, ob es strukturelle Unterschiede zwischen den *E. coli* Einzeldomänen-Rhodanesen GlpE, PspER und YgaPR gibt.

0,2 mg/ml Protein wurden an einem Jasco J-810 CD-Spektrometer in dem Wellenlängenbereich von 180-260 nm („ferner UV-Bereich“) gemessen. Die in Abb. 2.13 dargestellten Emissionsspektren bestätigten einen deutlichen strukturellen Unterschied zwischen den Rhodanesen. Kaum voneinander zu unterscheiden waren GlpE (grün) und PspER (blau). Ihre Spektren zeigten ein Maximum zwischen 200-210 nm und deuten auf eine sehr ähnliche Struktur hin. YgaPR stellte ein andersartiges Emissionsprofil dar, mit einer auffällig zulaufenden Spitze bei 205 nm. Im Vergleich mit Standardproteinen bekannter Konformationen zeigte YgaPR Homologie zu Spektren typischer α -helikaler Konformation.

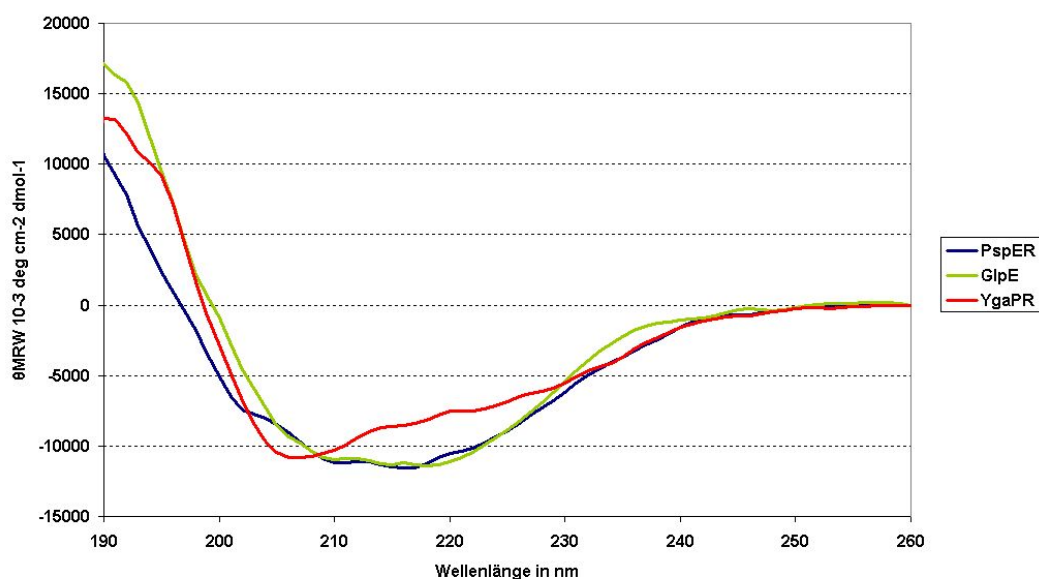


Abb. 2.13 Vergleich der Sekundärstruktur der Rhodanesen mittels CD-Spektroskopie

Um die Sekundärstrukturen der Rhodanesen miteinander zu vergleichen, wurden je 0,05 mg/ml Protein im „Fern-UV“ Bereich (180-260 nm) CD-spektrophotometrisch gemessen.

2.2.8.1 Detektion der Sekundärstruktur von GlpE, PspER und YgaPR nach Bildung der Persulfid-Gruppe

Durch Co-Inkubation der Rhodanesen GlpE, PspER und YgaPR mit Thiosulfat, sollte anhand von CD-Spektroskopie untersucht werden, ob es zu strukturellen Unterschieden bei Ausbildung einer Persulfidbindung kommt.

Je 0,2 mg/ml gereinigtes Protein wurde mit 10 mM bzw. 20 mM Thiosulfat inkubiert. Im Vergleich zur unbeladenen Rhodanese nach Cyanid-Inkubation konnte nach Inkubation mit Thiosulfat ein Shift im Elutionsprofil detektiert werden (Abb.2.14-2.16). Anhand der Messungen wird vermutet, dass durch Ausbildung des Persulfids am katalytischen Cystein der Rhodanese eine Änderung der Sekundärstruktur hervorgerufen wird.

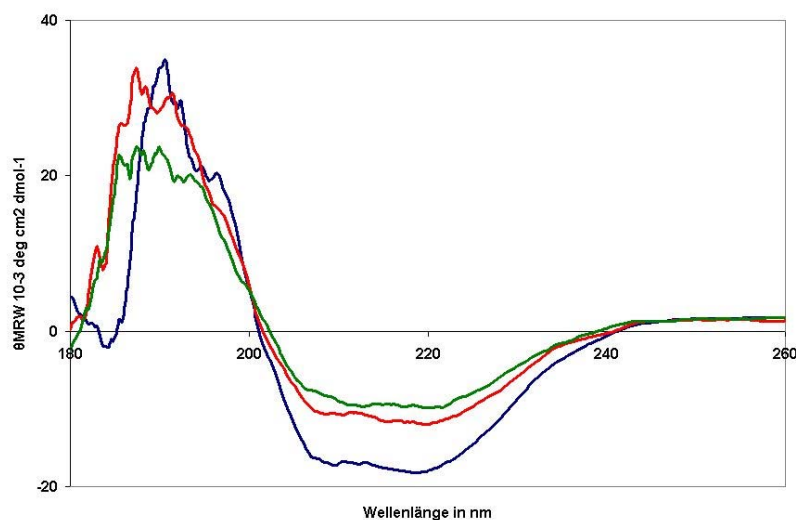


Abb. 2.14 CD-Spektroskopie von GlpE nach Thiosulfat-Inkubation

0,2 mg/ml GlpE wurden mit 10 mM (rot) bzw. 20 mM (grün) Thiosulfat inkubiert. Die Spektren zeigten, dass es durch Thiosulfatinkubation zu einer Konformationsänderung kam.

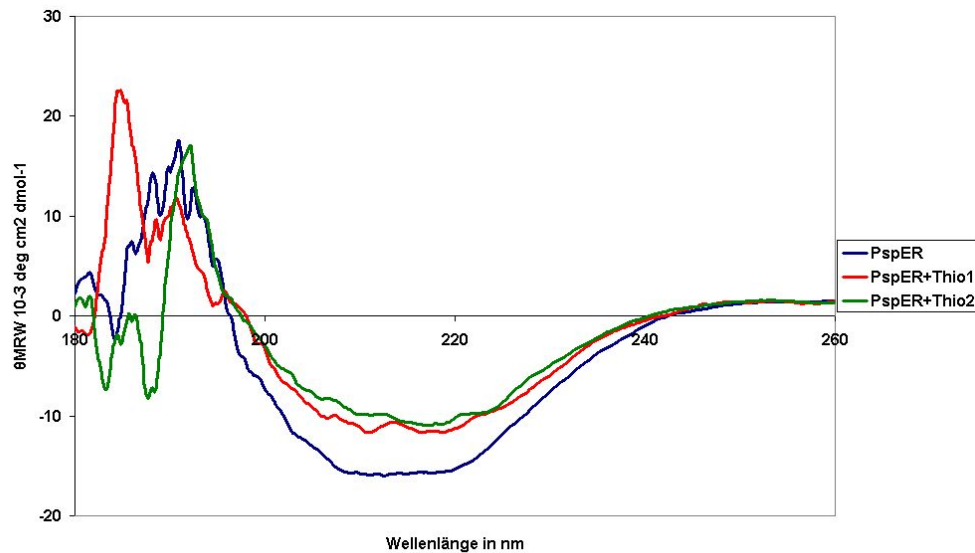


Abb. 2.15 Analyse der Sekundärstruktur von PspER mit Thiosulfat durch CD-Spektroskopie

In Anwesenheit von Thiosulfat kommt es zu einer Änderung der PspER-Sekundärstruktur. Im Ansatz wurden 0,2 mg/ml Protein mit 10 mM (rot) und 20 mM (grün) Thiosulfat inkubiert.

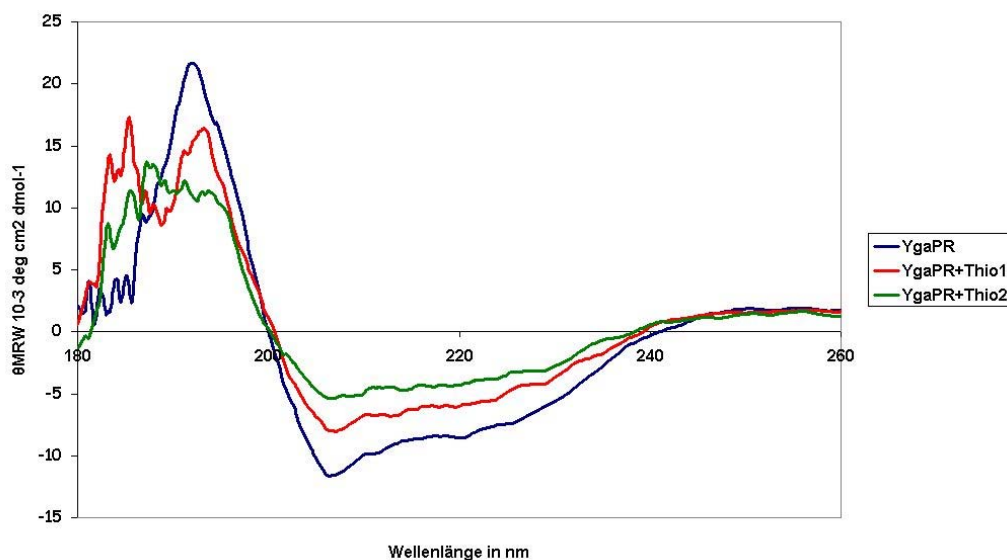


Abb. 2.16 Analyse der Konformationsänderung von YgaPR nach Inkubation mit Thiosulfat durch CD-Spektroskopie

Es konnte CD-spektroskopisch dargestellt werden, dass eine Änderung der YgaPR Sekundärstruktur stattfindet, wenn Thiosulfat im Ansatz ist. Je 0,2 mg/ml YgaPR wurden mit 10 mM (rot) und 20 mM (grün) Thiosulfat inkubiert.

2.2.9 Untersuchung der Nitratreduktase-Aktivität in *E. coli* Rhodanese-Mutantenstämmen

Um zu überprüfen, ob eine der Rhodanese spezifisch an der Moco-Biosynthese beteiligt ist, wurden zwei *E. coli* Mutantenstämmen auf Nitratreduktase Aktivität untersucht. Mit Ausnahme von *thil* bzw. *ybbB* sind in beiden Stämmen jeweils sieben Rhodanese-codierende Gene mutiert. Die Stämme wurden von T. Larson, Virginia Technical University, zur Verfügung gestellt. Gemessen wurde die Aktivität der *E. coli* Nitratreduktase im aufgeschlossenen Zellextrakt. In Tabelle 2.3 ist dargestellt, dass die Nitratreduktase Aktivität der Mutantenstämmen von 2.15 Units und 1.9 Units mit der Wildtyp-Aktivität von 2.0 Units vergleichbar ist. Daraus lässt sich schließen, dass keine der *E. coli* Rhodanese alleine als spezifischer Schwefeldonor der Moco-Biosynthese fungiert.

Tab. 2.4 Nitratreduktase-Aktivität der verschiedenen *E. coli* Rhodanese Mutantenstämmen

Stamm	Nitratreduktase Aktivität*
Wildtyp	2.0
$\Delta sseA$, $\Delta ygaP$, $\Delta ynjE$, $\Delta glpE$, $\Delta pspE$, $\Delta yceA$, $\Delta ybbB$ (<i>thil</i> +))	2.15
$\Delta sseA$, $\Delta ygaP$, $\Delta ynjE$, $\Delta glpE$, $\Delta pspE$, $\Delta yceA$, $\Delta thil$ (<i>ybbB</i> +))	1.90

*Nitratreduktase Aktivität wurde im Zellextrakt gemessen; ein Unit Nitratreduktase Aktivität entspricht der Reduktion von μmol Nitrat pro Minute pro mg Protein

2.3 *In vivo* Interaktionsuntersuchungen von MoeB und MoaD anhand des Hefe Tri-Hybrid Systems

Das Hefe Tri-Hybrid Systems ermöglicht die *in vivo* Identifizierung von Multi-Protein-Komplexen (139,140). Das Prinzip basiert auf dem pBridgeTM Vektor, der durch seine zwei „multiple cloning sites“ die gleichzeitige Expression eines Köder- und eines Brückenproteins gewährleistet. Dabei wird ein Protein an eine GAL4-DNA-bindende Domäne fusioniert. Das andere sogenannte „Brückenprotein“ wird an eine Kern-

Lokalisierungs Sequenz fusioniert, die einen essentiellen Teil der GAL4-DNA-bindende Domäne ausmacht (Abb.2.17). Das Brückenprotein unterliegt einem *MET25* Promotor und die Expression kann durch den Methioningehalt im Medium induziert werden. Nur durch die Interaktion von Köder- und Brückenprotein, sowie dem Protein mit fusionierter GAL4-aktivierender Domäne kommt es zur Initiierung der Reportergenexpression.

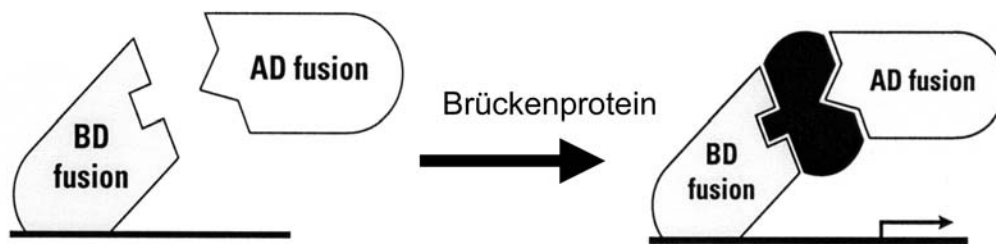


Abb. 2.17 Prinzip des Brückenproteins im Hefe Tri-Hybrid Systems

Der pBridge Vektor exprimiert ein Protein mit einer fusionierten DNA-bindenden Domäne (BD) und das „Brückenprotein“ (schwarz). Das Protein mit der aktivierenden Domäne (AD) wird separat exprimiert. Das Brückenprotein vermittelt eine Interaktion zwischen den Proteinen.

Es wurde angenommen, dass eine Schwefelübertragung im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese nur stattfinden kann, wenn MoeB und MoaD einen Adenylatkomplex bilden. Durch die Co-Expression von MoaD und MoeB im Hefe Tri-Hybrid System sollten so mögliche *in vivo* Interaktionspartner identifiziert werden.

Beide Proteine wurden auf ihre Funktion als Brückenprotein getestet. Verwertbare Daten konnten allerdings nur mit MoeB als Brückenprotein und MoaD mit fusionierter DNA-bindende Domäne erzielt werden (s.u.).

2.3.1 Analyse des Tri-Hybrid Screens

Die Expression und der Screen gegen eine *E. coli* DNA Bank (im pGADT10 Vektor) fand im *Saccharomyces cerevisiae* AH109 Stamm statt. Es wurde auf höchster Stringenz (SD -Leu, -Trp, -His, -Ade, -Met) auf Interaktion selektiert. Im β -Galaktosidase-Assay wurde anschließend auf Interaktion getestet.

In Tabelle 2.4 sind die detektierten Sequenzen der isolierten Plasmide aufgeführt. Bislang konnte keines der identifizierten Proteine in einen sinnvollen Zusammenhang

mit MoeB und/oder MoaD gebracht werden. Auffällig war, dass keine anderen in der Moco-Biosynthese involvierten Proteine wie z.B. MoaE gefunden wurden.

Tab. 2.5 Identifizierte Sequenzen im Tri-Hybrid System

<u>Gen</u>	<u>Funktion</u>	<u>Anzahl unabhängiger Klone</u>	<u>Datenbank- eintrag</u>
yeeF	hypothetisches Aminosäure Transportprotein	2	gi 15832070
cobT	Nicotinat-Nucleotid-Dimethylbenzimidazol- P-Phosphoribosyl-Transferase	2	gi 15832040
b1027	putatives Transposase verwandtes Protein	3	gi 16128991
z1869	hypothetisches Protein	2	gi 25301722
feaR	Phenylacetaldehyd Dehydrogenase	1	gi 7466862
cycA	Transportprotein kleiner Moleküle: Aminosäuren, D-Alanin, D-Serin, Glycin	1	gi 13364663
maoB	Phenylacetaldehyd Dehydrogenase	1	gi 49176104
c0038	hypothetisches Protein	1	gi 26245953
NuoE	NADH Dehydrogenase I	1	gi 15832423
ECs2785	Hypothetisches Protein	1	gi 15832039
b0392	Hypothetisches Protein	1	gi 15829696
xylF	Xylulokinase	1	gi 15833703
relB	Negativer Translationsregulator	1	gi 72949
yrdD	putative DNA-Topoisomerase	1	gi 13363622
yegQ	Hypothetisches Protein	1	gi 15832143
ECs1715	N-Acetylglucosamin-6-phosphat- deacetylase	1	gi 15830969
dksA	DnaK Repressor	1	gi 15829403

2.4 Die Tandem Affinity Purification (TAP) Methode

Da im Hefe Tri-Hybrid System keine neuen Interaktionspartner von MoaD und MoeB identifiziert werden konnten, wurde die von Gully *et al.* (2003) für *E. coli* etablierte

TAP-Methode zur Reinigung von Proteinkomplexen angewendet. Die Tandem Affinity Purification (TAP) Methode ermöglicht es, Protein-Komplexe unter nativen Bedingungen zu reinigen. Sie wurde ursprünglich von Séraphin *et al.* (123) für *Saccharomyces cerevisiae* entwickelt und von Gully *et al.* (122) für *E. coli* etabliert. Die Methode basiert auf der Fusion eines Köderproteins mit einem C- oder N-terminalen TAP-Tag. Der TAP-Tag besteht aus einer IgG-bindenden Domäne des *Staphylococcus aureus* Protein A (Prot A) und einer Calmodulin bindenden Domäne (CBP). Beide Domänen sind durch eine TEV Protease cleavage site getrennt. Der N-terminale TAP-Tag besitzt noch eine zusätzliche Enterokinase (EK) cleavage site.

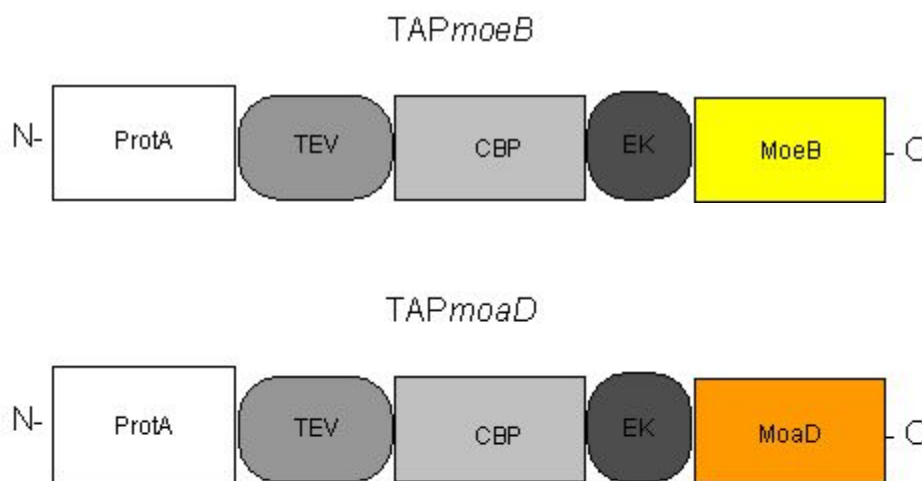


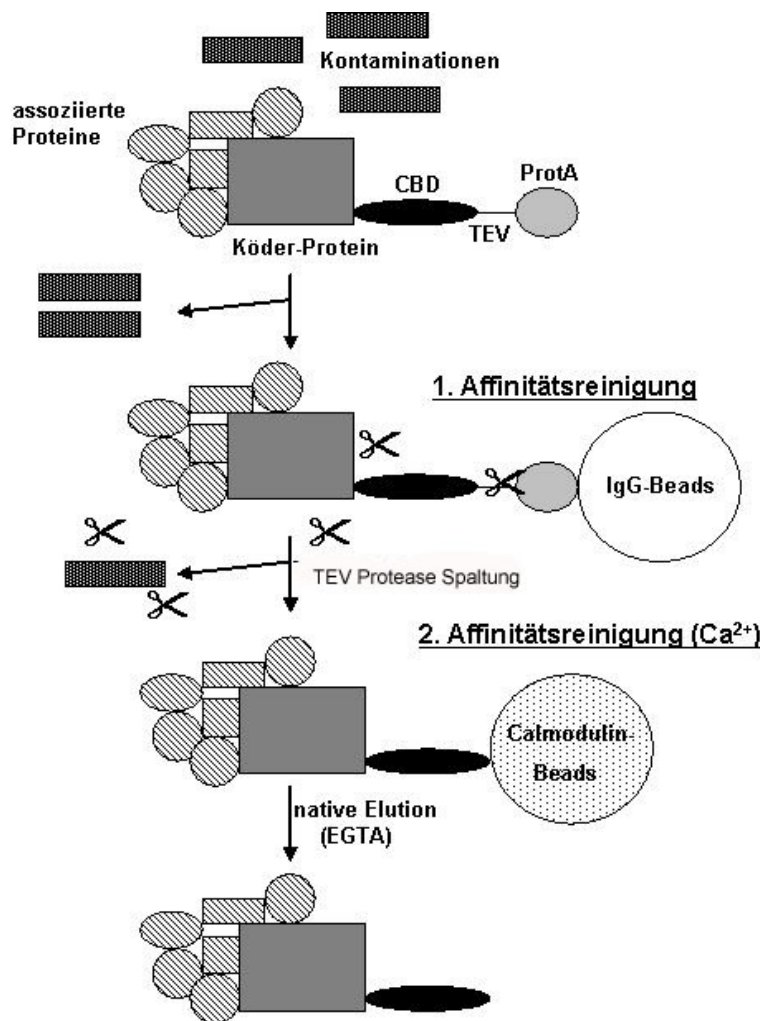
Abb. 2.18 TAP-Konstrukte

Die Nukleotidsequenz von *moeB* und *moaD* wurde an den N-terminalen TAP-Tag des pEB327 Vektors fusioniert (TAP*moeB*; TAP*moaD*).

Die Nukleotidsequenzen von *moeB* und *moaD* sind an den N-terminalen TAP-Tag des pEB327 Vektors kloniert worden (Abb. 2.18).

Das Reinigungsprinzip der TAP-Methode beruht auf zwei Affinitätsschritten:

Zuerst bindet die Protein A-Domäne des Köderproteins an eine IgG-Matrix. Anschließende Waschschrte gewährleisten, dass nur spezifische Protein-Protein-Interaktionen bestehen bleiben. Durch die Inkubation mit einer TEV Protease wird die Protein A-Domäne abgespalten und das Protein von der Matrix eluiert. Im zweiten Affinitätsschritt erfolgt die Bindung an eine Calmodulin-Matrix. Protein-Komplexe können durch EGTA eluiert werden (Abb. 2.19)

**Abb. 2.19**

Übersicht der TAP-Methode nach Séraphin et al. (123)

Die Aufreinigung der mit dem Köderprotein interagierenden Proteine erfolgt durch zwei Affinitätsreinigungsschritte. Im ersten Schritt bindet die Protein A Domäne (ProtA) des TAP-Tags an eine IgG-Matrix. Anschließend wird die Protein A Domäne durch Inkubation mit einer TEV Protease abgespalten und die Calmodulin bindende Domäne (CBD) freigelegt. Diese bindet an eine Calmodulin Matrix und der gereinigte Protein-Komplex kann anschließend durch Zugabe von EGTA eluiert werden.

2.4.1 Kontrolle der TAP-Konstrukte auf *in vivo* Aktivität

Um festzustellen, ob die TAP-Tag-Fusion Auswirkungen auf die Aktivität von MoeB bzw. MoeD hat, wurde im Nitratreduktase Overlay-Assay die funktionelle Komplementation der *E. coli* Mutantenstämme *moeB*(DE3) und *moeD*(DE3) (57) durch Transformation mit TAP*moeB* und TAP*moeD* getestet. Die Färbung der Transformanten in Abb. 2.20 bestätigte, dass der *E. coli* Mutantenstamm *moeB*(DE3) nur durch das Konstrukt TAP*moeB* und die *E. coli* Mutante *moeD*(DE3) nur durch TAP*moeD* komplementiert wird. Das bedeutet, dass der TAP-Tag keine Auswirkungen auf die Proteinaktivität von MoeB und MoeD *in vivo* hat.



Abb. 2.20 Overlay-Assay der *E. coli moeB*(DE3)- und *moaD*(DE3)-Mutante

Die *E. coli* Mutanten *moeB*(DE3) und *moaD*(DE3) wurden mit den Konstrukten TAP*moeB* und TAP*moaD* transformiert und auf Nitratreduktase-Aktivität überprüft.

Die *E. coli moeB*(DE3) Mutante im linken Bild wird nur durch das TAP*moeB* Konstrukt komplementiert, die *moaD*(DE3) im rechten Bild dagegen nur von TAP*moaD*. Der TAP-Tag hat demnach keinen Einfluss auf die Proteinaktivität.

2.4.2 Untersuchung von *in vivo* Protein-Interaktionen anhand der TAP-Methode

Für die Analyse der *in vivo* Protein-Interaktion wurden die *E. coli* Mutantenstämme *moeB*(DE3), *moaD*(DE3) und CL100(*iscS*) verwendet. Der *moeB*(DE3) Stamm enthält eine Punktmutation im *moeB* Gen, wodurch *moeB* zwar noch transkribiert wird, jedoch das Protein inaktiv vorliegt. Der *E. coli* CL100(*iscS*) Stamm trägt eine in-frame Deletion des *iscS* Gens (107), wodurch andere Sulfurtransferasen hochreguliert werden und somit einfacher zu identifizieren sind. Eine 2-Liter-Expressionskultur der TAP-Konstrukte wurde bei einer $OD_{600} = 0,8$ mit 0,01 % Arabinose induziert und für 4 Stunden bei 30 °C exprimiert. Die Elutionsfraktionen sind nach der Calmodulin-Affinitätssäule ankonzentriert (MWCO 3.000), auf ein 15 % iges SDS-PAGE aufgetragen und Coomassie gefärbt worden.

Die aufgetragenen Elutionsfraktionen des in der *iscS* DE3-Mutante exprimierten TAP*moeB* Konstrukt zeigten zwei Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa. Eine Immunodetektion mit einem MoeB-Antikörper ergab, dass beide Banden von dem MoeB Antikörper erkannt wurden (Abb.2.21).



Abb. 2.21
Westernblot der
Elutionsfraktion aus
ΔiscS DE3TAPmoeB

In der Westernblot Analyse erkennt der MoeB-Antikörper in der Elutionsfraktion (Spur 1) zwei um die 30 kDa große Banden.

Anhand von Elektrospray-Ionisations-Tandemmassenspektrometrie (ESI-MS/MS) Analyse konnte festgestellt werden, dass es sich bei der oberen Bande um MoeB (26 kDa) mit fusionierter N-terminaler Calmodulin bindender Domäne (3666 kDa) handelte. Die untere Bande wurde als endogenes MoeB identifiziert, das mit dem eingesetzten TAP-markierten MoeB co-gereinigt wurde.

Generell konnten auch nach mehreren Wiederholungen keine interagierenden Proteine mit dem TAP*moaD* Konstrukt identifiziert werden. Aus diesem Grund fanden nur Analysen und Identifizierungen der Proteinbanden statt, die aus Elutionsfraktionen der Expression von TAP*moeB* in der *E. coli iscS* -Mutante isoliert wurden.

Auffällig war, dass in fast allen SDS-PAGE-Analysen Banden zwischen 50 und 60 kDa detektiert werden konnten. Die ESI-MS/MS-Analyse identifizierte diese Proteinbanden als Keratin. Yokota *et al.* (2000) konnten zeigen, dass diese artifiziellen Keratin-Verunreinigung auch ohne Proteinbeladung in SDS-Polyacrylamidgelen vorhanden sind (141). Aufgrund dessen lassen sich diese Verunreinigungen kaum vermeiden.

In Abb. 2.22 und 2.23 ist die Analyse weiterer Elutionsfraktionen dargestellt, die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden ebenfalls durch Massenspektrometrie analysiert und identifiziert. Die *E. coli* Datenbank-Peptidanalyse der in Abb. 2.22 ca. 20 kDa große Bande (Pfeil 2) zeigte an erster Stelle Homologien zu MoeB (gil16128794) und an zweiter Stelle zur putativen Thiosulfate Sulfurtransferase YnjE (gil1742867). Es mußte sich dabei um Abbauprodukte handeln, da MoeB 26 kDa und

YnjE 48 kDa groß sind. Die eindeutige Anwesenheit von YnjE in diesem Fragment konnte allerdings durch Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) nicht bestätigt werden, was durch eine zu niedrige Konzentration erklärt werden könnte.

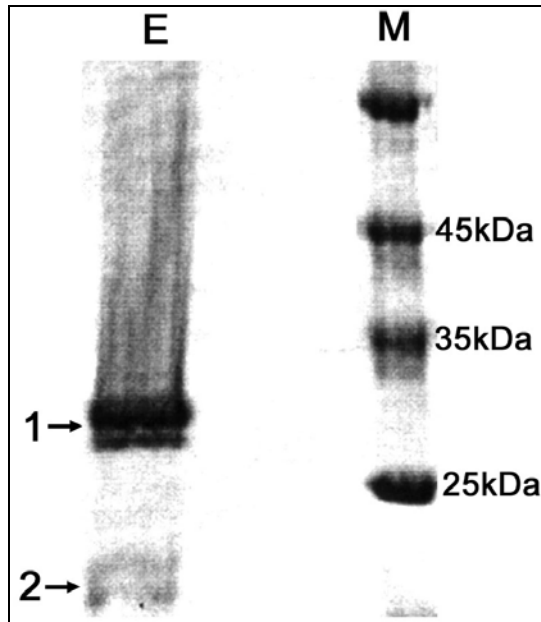


Abb. 2.22

**Elutionsfraktion 1 von $\Delta iscS$ DE3
TAPmoeB**

Coomassie gefärbtes 15 % SDS-PAGE mit Elutionsfraktion (E) aus $\Delta iscS$ DE3 TAPmoeB. Pfeil 1 zeigt die MoeB-Doppelbande (MoeB mit TAP-Tag, endogenes MoeB). Die ca. 20 kDa große Bande (Pfeil 2) wurde in der MS-Analyse als MoeB und YnjE identifiziert.

Die 45 kDa Bande einer weiteren Elutionsfraktion von $\Delta iscS$ DE3 TAPmoeB (Abb 2.23; Pfeil 4) wurde in der Peptid-Datenbankanalyse an erster Stelle als MoeB (gil16128794) und an zehnter Stelle als YnjE (gil1742867) identifiziert.

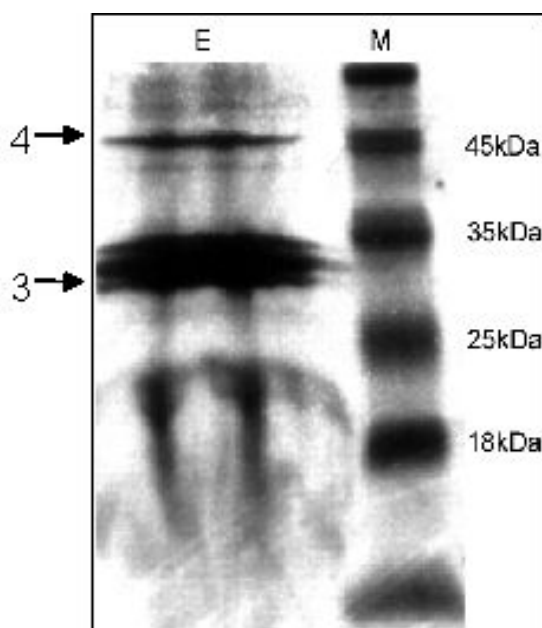


Abb. 2.23

**Elutionsfraktion 2 von $\Delta iscS$
DE3TAPmoeB**

Die MS-Analyse der Coomassie gefärbten Gelbande (Pfeil 4) ergab an erster Stelle eine Peptidübereinstimmung mit MoeB und an zehnter Stelle mit YnjE. Pfeil 3 zeigt die MoeB-Doppelbande.

Da die Möglichkeit besteht, dass in den mit MoeB co-eluierten Proteinen YnjE vorhanden ist, das aufgrund von zu geringer Konzentration nicht eindeutig identifiziert werden konnte, sollte über direkte Protein-Protein Interaktion gezeigt werden, ob MoeB mit YnjE interagiert (Kap.2.5.1).

In Tab. 2.6 sind alle Proteine aufgelistet, die in fünf ESI-MS/MS Analysen mehr als einmal identifiziert werden konnten.

Tab. 2.6 Aus der *E. coli* iscSDE3 TAPmoeB Mutante isolierte und anhand von ESI-MS/MS Analyse identifizierte Proteine

Beschreibung	Datenbank-eintrag	Anzahl unabhängiger Klone
MoeB	gil16128794	5
putativen Thiosulfate Sulfurtransferase YnjE	gil1742867	3
Pyruvat Dehydrogenase	gil15799798	2
GroEL	gil15804735	1
Molybdenum Transporter ModB	gil17380395	1
Cold shock-like protein	gil1778540	2
Nitrite/Nitrite Antwort Regulator NarQ	gil15802746	1
anaerobe Dimethyl Sulfoxid Reductase	gil26246921	1
Hypothetisches Protein yjgL	gil18266863	1
Putative Transposase	gil26247096	1
Protein-Export Protein secB	gil26250254	1
ATPase	gil1071643	2
Putative Format Acetyltransferase	gil15832699	1
möglicher Molybdat Metabolismus Regulator, ähnlich zum C-terminalen Bereich des Molybdat-Metabolismus-Regulator molR	gil25376664	1
Hypothetisches Protein b2305	gil15802852	1
Malatdehydrogenase	gil2289309	1
Acyl-CoA Dehydrogenase	gil4902957	2
Putative Aldehyddehydrogenase	gil15801699	1
Hypothetisches Protein Z3059	gil15802400	1
Elongation-Faktor Tu 59-263	gil223399	1
30S ribosomale Untereinheit	gil15799851	2
Cytidin Deaminase	gil16130081	1
Myosinkinase	gil125493	1
Glycerinaldehyd-3-Phosphatase Dehydrogenase	gil24112825	1
Hypothetisches ABC Transporter Protein YheS	gil26249951	1
Keratin	gil71528	5

2.5 Charakterisierung der *E. coli* Rhodanese YnjE

YnjE ist eine der insgesamt acht *E. coli* Rhodanese-ähnlichen Proteine und hat eine Größe von 48 kDa. Das Protein besteht aus drei Rhodanesedomänen, wobei nur die C-terminale Domäne das katalytische Cystein besitzt (Abb.2.24). Über die Funktion von YnjE in *E. coli* ist bislang noch nichts bekannt.

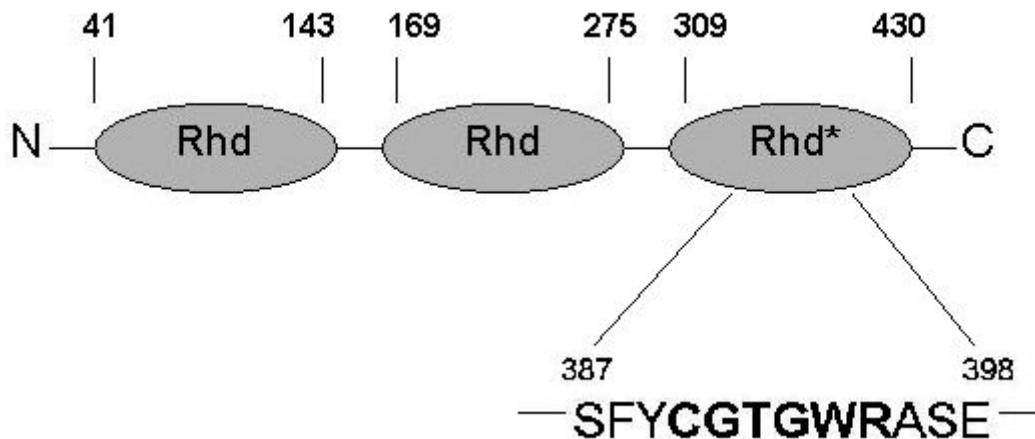


Abb. 2.24 Die *E. coli* Rhodanese YnjE

YnjE ist 48 kDa groß und besteht aus 3 Rhodanesedomänen (Rhd), wobei nur die C-terminale Domäne das katalytische Cystein besitzt (*). Die Sequenz des „active site loop“ ist dargestellt.

2.5.1 Co-Expression von YnjE in der TAP-Methode

Um die *in vivo* Interaktion zwischen YnjE und MoeB aus den vorangegangenen TAP-Daten zu bestätigen, wurde YnjE mit dem TAP-Tag fusionierten MoeB in dem *E. coli moeB⁻* (DE3) Stamm coexprimiert. Dazu wurde die *ynjE* Nukleotidsequenz aus dem Plasmid pPJ15 amplifiziert und in den pACYCDuetTM-1 Vektor kloniert.

Das pACYCDuetTM-1*ynjE* Konstrukt und das TAP*moeB* Plasmid (Kap.2.4) wurden zusammen in den *moeB⁻* (DE3) Stamm cotransformiert.

Die Expression und Aufreinigung erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben mit dem Unterschied, dass zusätzlich die Expression von YnjE durch 0,01 % IPTG induziert wurde. Die auf ein 15 %iges SDS-PAGE aufgetragenen Elutionsfraktionen sind in Abb. 2.25 gezeigt. Das es sich um eine spezifische Proteinbindung handelte, konnte durch die Fraktionen E1-E4 bestätigt und dargestellt werden, in denen mit

zunehmendem Elutionspuffervolumen YnjE und MoeB zusammen von der Calmodulin-Matrix eluiert werden können. Die Fraktionen W1-W4 zeigen die Waschfraktionen von der IgG-Matrix. In den Waschfraktionen nach der Calmodulin-Matrix-Inkubation konnten keine Proteinbanden detektiert werden (Daten nicht gezeigt). In Fraktion E4 war, neben der bereits in Kap. 2.4.2 beschriebenen MoeB-Doppelbande, eine zusätzliche (schwarz umrahmte) 45 kDa Bande im Gel angefärbt. Diese Bande wurde aus dem Gel eluiert und massenspektrometrisch eindeutig als YnjE identifiziert. Somit konnte die Interaktion von MoeB und YnjE *in vivo* durch die TAP-Methode erneut bestätigt werden.

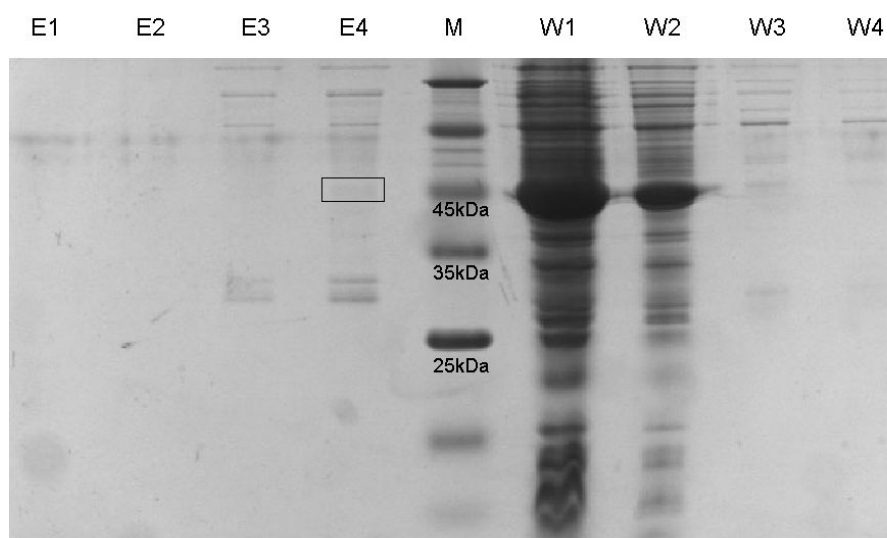


Abb. 2.25 Co-Expression und Reinigung von YnjE und TAP-MoeB

Das Coomassie gefärbte 15%iges SDS-PAGE zeigt die Elutionsfraktionen (E1-E4) der Coexpression von TAP-MoeB und YnjE in *moeB* (DE3). Die umrahmte Bande wurde in der MS-Analyse als YnjE identifiziert. In den Spuren W1-W4 sind die Waschfraktionen nach der IgG-Matrix aufgetragen.

2.5.2 Expression und Aufreinigung von YnjE

Um die Funktion von YnjE in der Moco-Biosynthese genauer zu analysieren, sollte YnjE gereinigt und charakterisiert werden. Die YnjE-Expression erfolgte anhand des Plasmids pPJ15 in dem *E. coli* Expressionsstamm BL21 DE3 (Novagen). Die Aufreinigung fand über den C-terminal fusionierten His-Tag des Proteins durch Ni-NTA Chromatographie statt. Da nach der Ni-NTA Aufreinigungen noch Verunreinigungen zu erkennen waren, wurde das Protein weiter über eine Superose

12 Gelfiltrationssäule gereinigt. Es konnte gezeigt werden, dass YnjE in der Lösung als Monomer vorliegt. Nach der YnjE-Aufreinigung ist eine ca. 26 kDa große Bande im SDS-PAGE zu beobachten (Abb. 2.26), wobei es sich um co-gereinigtes MoeB handeln könnte.

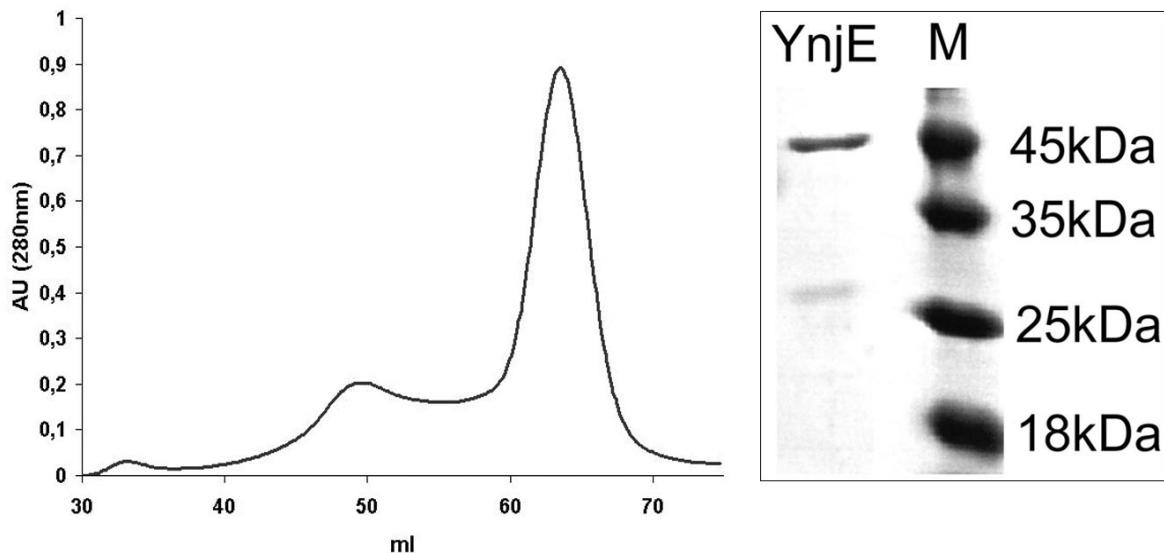


Abb. 2.26 Aufreinigung des Rhodanese-ähnlichen Proteins YnjE

Nach der Ni-NTA Chromatographie wurde das ankonzentrierte YnjE über eine Superose 12 Gelfiltrationssäule gereinigt. Das 15 %ige SDS-PAGE zeigt das gereinigte Protein.

2.5.2.1 Analyse der Sulfurtransferaseaktivität von YnjE mit Thiosulfat, β -Mercaptopyruvat und L-Cystein als Schwefeldonoren

Das „active site loops“ Motiv von YnjE kann, nach Bordo & Bork (99), nicht eindeutig einer Thiosulfat:Cyanid Sulfurtransferase oder 3-Mercaptopyruvat:Cyanid Sulfurtransferase zugeordnet werden. Aufgrund dessen sind L-Cystein, Thiosulfat und 3-Mercaptopyruvat *in vitro* als Schwefeldonoren für YnjE im Sörbos-Assay, mit Cyanid als Schwefelakzeptor, getestet worden. Es stellte sich heraus, dass in keinem Ansatz ein Thiocyanat-Komplex detektiert werden konnte und somit keine der drei Schwefelquellen in der Lage war YnjE zu aktivieren.

2.5.3 Analyse der Konformationsänderung bei Schwefelbeladung durch „Fern-UV“ CD-Spektroskopie

Durch CD-Spektroskopie sollte die Sekundärstruktur von YnjE untersucht werden. Dafür wurden 0,2 mg/ml unbeladenes Protein mit 10 mM bzw. 20 mM Thiosulfat inkubiert und im Wellenlängenbereich von 180 - 260 nm („ferner UV-Bereich“) gemessen. Die Thiosulfatinkubation von YnjE führte zu einem Peakshift des Spektrums (Abb. 2.27). Kontrollen von YnjE und Thiosulfat zeigten keine Veränderungen. Mit β -Mercapropyruvat als Schwefeldonor im Ansatz wurden keine Veränderungen beobachtet. Das Spektrum der Sekundärstruktur von YnjE ähnelt denen von GlpE und PspER in Kap. 2.2.8, mit einem charakteristischem Peak bei 220 nm. Die Analyse bestätigte, dass sich die Konformation der YnjE-Sekundärstruktur ändert, wenn eine Persulfidbindung am Protein stattfindet.

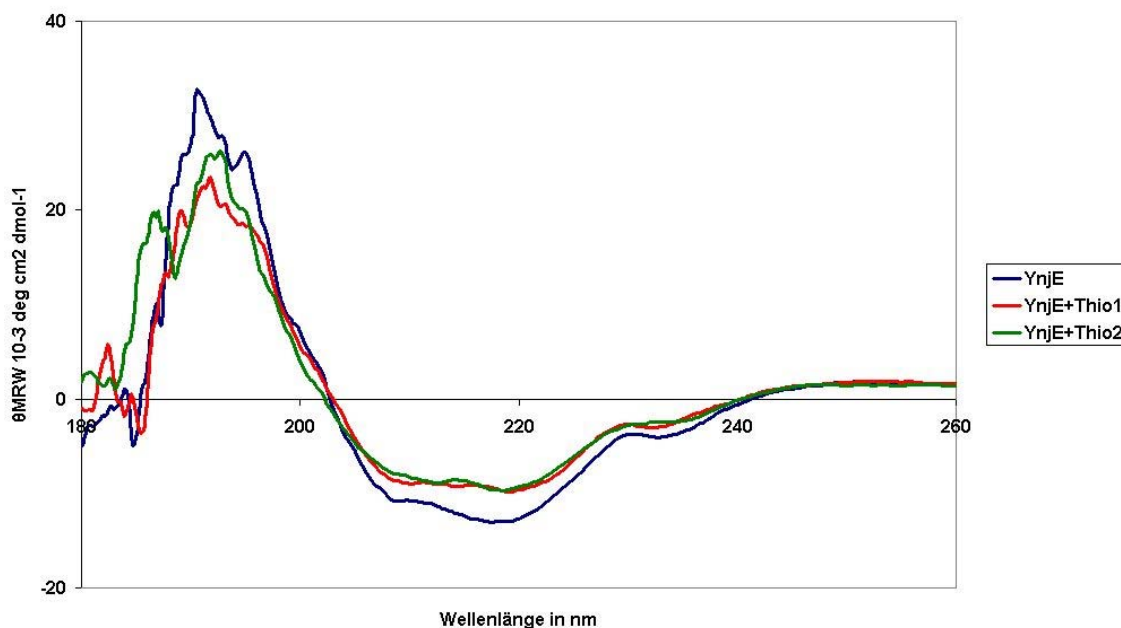


Abb. 2.27 Analyse der Sekundärstruktur von YnjE

0,2 mg/ml unbeladenes YnjE wurden mit 10 mM (Thio1) und 20 mM (Thio2) Thiosulfat inkubiert. Nach der Thiosulfatinkubation kommt es durch die Persulfidbindung am YnjE zu einer Konformationsänderung der Sekundärstruktur.

2.5.4 *In vitro* Assemblierung von YnjE, MoeB und inaktiver MPT-Synthase

Ob es zu *in vitro* Assemblierungen von YnjE, MoeB und der inaktiven MPT-Synthase kommt, sollte durch chromatographische Gelfiltration anhand einer analytischen Superdex 200 Säule untersucht werden. Die Aufreinigung von MoeB und der inaktiven MPT-Synthase erfolgte nach der unter Ref. 52 und 70 beschriebenen Methode.

Je 5 nmol YnjE, MoeB und inaktive MPT-Synthase wurden zunächst einzeln auf die Superdex 200 Säule aufgetragen und die Fraktionen im SDS-PAGE analysiert (Abb. 2.28). MoeB (53 kDa) und die inaktiven MPT-Synthase (51 kDa) eluierten bei einem Volumen von 15 ml, YnjE (48 kDa) bei 16,5 ml. Nach 30 minütiger Co-Inkubation von MoeB, YnjE und inaktiver MPT-Synthase und der chromatographischen Auftrennung, konnte kein YnjE-Peak bei 16,5 ml, jedoch zwei neue Peaks bei 13,7 ml und 16 ml detektiert werden. Die anschließende SDS-PAGE-Analyse dieser Fraktionen bestätigte eine Veränderung der Proteininteraktionen. Die kleine Untereinheit der MPT-Synthase, MoaD, hatte sich von der großen Untereinheit MoaE gelöst und an MoeB gebunden (Fraktion 8 und 9). Daneben wurde MoaE zusammen mit YnjE in den Fraktionen 10 - 12, sowie alleine in Fraktion 13 detektiert. Es konnte also anhand des Elutionsprofil und der SDS-PAGE-Analyse beobachtet werden, dass es zu Wechselwirkungen zwischen YnjE und MoaE gekommen ist.

Die Fraktionen 8 und 9 zeigten eine neue, bislang unbekannte ca. 30 kDa große Bande.

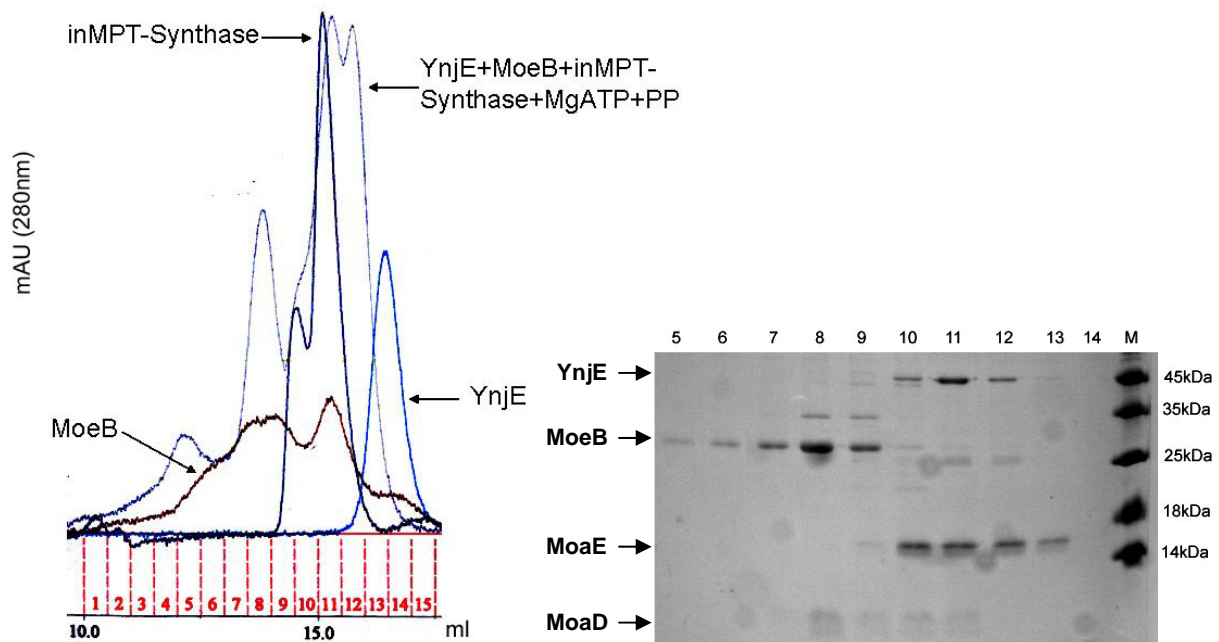


Abb. 2.28 *In vitro* Assemblierung und Analyse durch Gelfiltration von YnjE, MoeB und inaktiver MPT-Synthase

Je 5 nmol YnjE, MoeB und inaktive MPT-Synthase wurden zusammen mit 2,5 mM MgATP und 3 Units inorganischer Pyrophosphatase für 30 Minuten bei RT inkubiert und anschließend über eine Superdex 200 Säule gelfiltriert. Die Analyse der gesammelten Elutionsfraktionen fand anhand 15 %iges SDS-PAGE statt.

2.5.4.1 Immunoblot-Analyse der in der *in vitro* Assemblierung detektierten 30 kDa Bande

Um die neue 30 kDa Bande (Fraktionen 8 und 9) näher zu charakterisieren, wurde eine Immunoblot Analyse mit einem monoklonalen His-tag Antikörper durchgeführt. Von den eingesetzten Proteinen besaß nur YnjE einen C-terminal fusionierten His-tag. Die Gelfiltrationsfraktionen 5 - 14 wurden auf ein 15 %iges SDS-PAGE aufgetragen, auf eine PVDF-Membran geblottet und mit einem His-Tag Antikörper sowie sekundärem anti-Maus Antikörper inkubiert und aufgearbeitet. Abb. 2.29 zeigte, dass der His-Tag Antikörper neben der YnjE Bande (Fraktionen 10 - 12) auch die Banden in den Fraktionen 8 und 9 detektierte. Da MoeB (Fraktionen 7 - 9) und die inaktive MPT-Synthase (Fraktionen 8 - 13) vom Antikörper nicht erkannt wurden, ist eine unspezifische Antikörperbindung ausgeschlossen. Anhand der Immunoblot Analyse konnte die 30 kDa Bande in den Fraktionen 8 und 9 eindeutig als YnjE identifiziert werden.

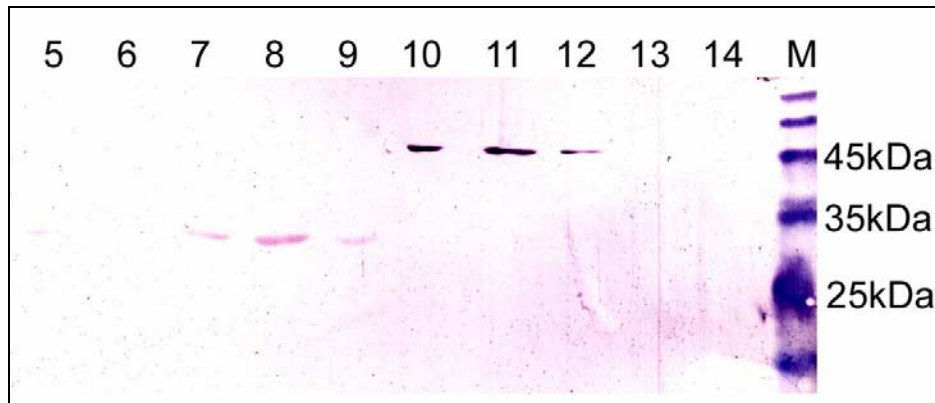


Abb. 2.29 His-tag Westernblot der Gelfiltrationsfraktionen

Die Elutionsfraktionen der Gelfiltration wurden auf ein 15 % SDS PAGE aufgetragen, auf eine PVDF Membran gebロットet und mit einem monoklonalem His-tag Antikörper sowie sekundärem anti-Maus Antikörper inkubiert. Da MoeB und die inaktive MPT-Synthase keinen His-Tag besaßen und vom Antikörper nicht erkannt wurden, musste es sich bei der 30 kDa Bande um ein C-terminales Fragment von YnjE handeln.

2.5.5 Immunpräzipitation von MoeB, inaktiver MPT-Synthase und den *E. coli* Rhodanesen YnjE, GlpE, PspER und YgaPR

Um weitere Beweise für eine *in vitro* Interaktion von YnjE mit MoeB zu erhalten, sollte durch Immunpräzipitation analysiert werden, ob die *E. coli* Rhodanesen YnjE, GlpE, PspER und YgaPR mit MoeB und inaktiver MPT-Synthase interagieren. Es wurde überprüft, ob MoeA und MoeD die Interaktion zwischen MoeB und den Rhodanesen beeinflussen. Dafür ist ein polyklonaler MoeB Antikörper (aus Kaninchen) an Protein G SepharoseTM Beads immobilisiert und anschließend mit den gereinigten Proteinen inkubiert worden. Im Fall einer Wechselwirkung zwischen einer Rhodanese und MoeB, können beide Proteine copräzipitiert und im Gel analysiert werden.

Um unspezifische Interaktionen zwischen den Protein G SepharoseTM Beads und den einzelnen Proteinen auszuschließen, wurden alle Proteine einzeln, sowohl mit MoeB Antikörper gekoppelten, als auch mit ungekoppelten Beads inkubiert. In den Ansätzen mit ungekoppelten Beads konnten keine Proteine im Gel detektiert werden. Die Abbildungen 2.30 - 2.33 der Kontrollinkubationen bestätigten, dass es zu keiner unspezifischen Bindung zwischen den einzelnen Proteinen und den mit Antikörper gekoppelten Beads kam. Generell war in allen Elutionsfraktionen eine ca. 45 kDa große Bande zu erkennen, bei der es sich um die schwere Kette (HeCh) des MoeB-Antikörpers handelte. In der Proteinansatzfraktion (P) von YnjE (Abb. 2.30 rechts)

sind drei Banden zu erkennen, die bereits nach der Aufreinigung von YnjE zu beobachten sind. Es kann sich dabei um das Monomer (48 kDa), das Dimer (96 kDa) sowie zwei abgespaltene Untereinheiten (26 bzw. 16 kDa) handeln. Möglich ist auch, dass die 26 kDa Bande co-gereinigtes MoeB zeigt (s.Kap.2.5.2).

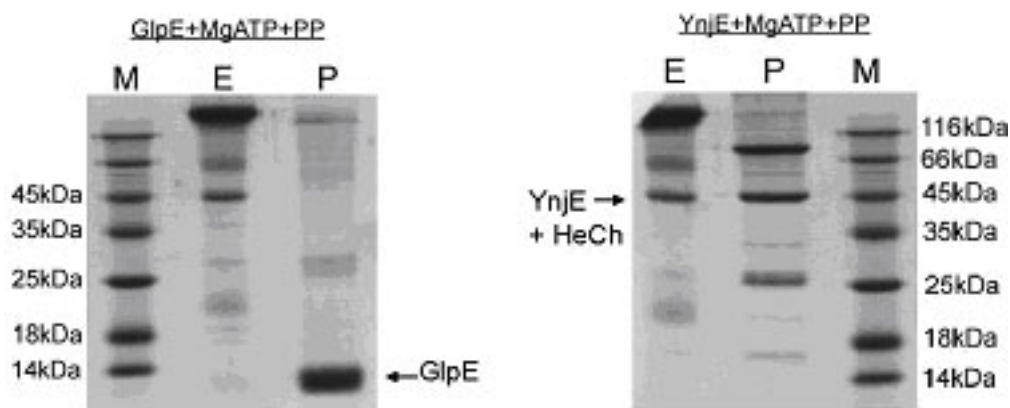


Abb. 2.30 Kontrolle auf Interaktion zwischen Protein G Sepharose™ Beads und YnjE bzw. GlpE

Die Proteine GlpE (links) und YnjE (rechts) wurden mit MoeB Antikörper gekoppelten Protein G Sepharose™ Beads inkubiert. Auf dem 15 %igen SDS-PAGE war in beiden Elutionsfraktionen (E) kein Protein aus der Ansatzfraktion (P) zu erkennen. Bei der 45 kDa Bande in der Elutionsfraktionen handelte es sich um die schwere Kette (Heavy Chain; HeCh) des MoeB-Antikörpers bzw. YnjE. Bei den drei Banden in der YnjE-(P)-Fraktion kann es sich um das YnjE-Monomer, -Dimer, -Abbauprodukte oder auch co-gereinigtes MoeB (26 kDa) handeln.

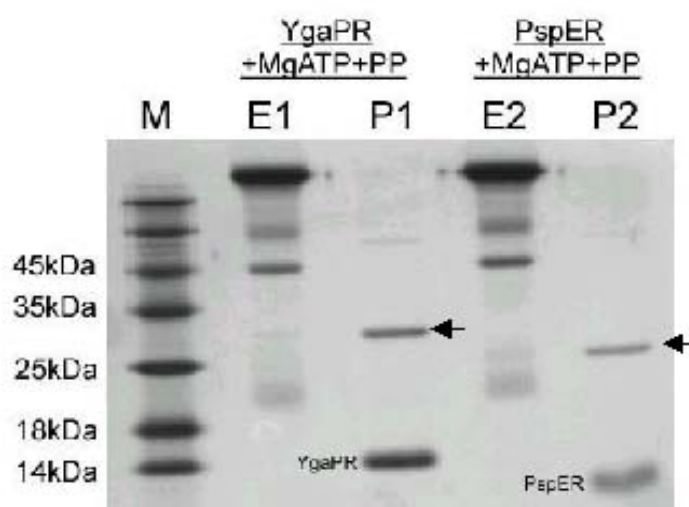
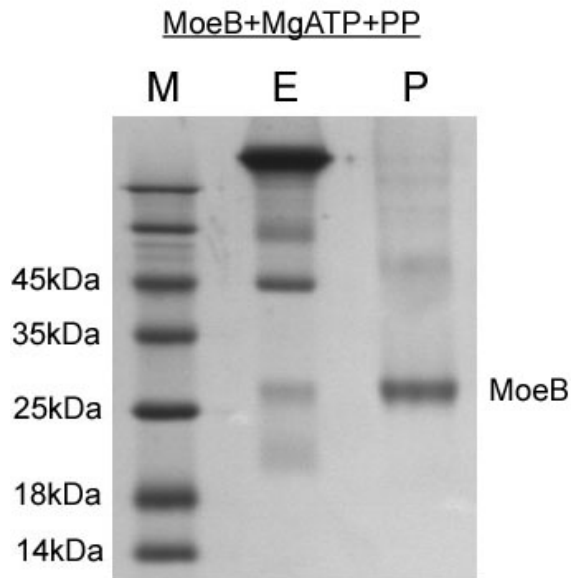


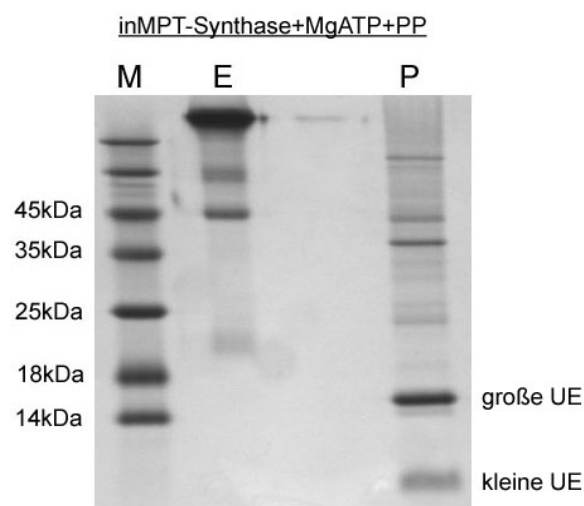
Abb. 2.31 Inkubation von YgaPR und PspER mit gekoppelten ProteinG Sepharose™ Beads

In den Elutionsfraktionen (E1 und E2) der Rhodanesen YgaPR und PspER ist auf dem 15 %igen SDS-PAGE kein Protein aus der den Proteinansatz (P1 und P2) zu erkennen. Die Pfeile markieren die kovalenten Dimere von YgaPR und PspER.

**Abb. 2.32**

**Kontrolle von MoeB mit
gekoppelten Protein G
Sepharose™ Beads**

Die Elutionsfraktion (E) zeigt, dass MoeB aus dem Probenansatz (P) an den gekoppelten MoeB Antikörper gebunden hatte.

**Abb. 2.33**

**Interaktionskontrolle von
Inaktiver MPT-Synthase mit
gekoppelten Protein G
Sepharose™ Beads**

In der Proteinansatzfraktion (P) des Coomassie gefärbten 15 %igen SDS PAGE, waren deutlich die große und die kleine Untereinheiten (UE) der MPT-Synthase zu erkennen. In der Elutionsfraktion (E) konnten die Banden nicht beobachtet werden.

Nachdem die Kontrollansätze keine unspezifische Bindung an den MoeB-Antikörper bestätigten, wurden die Proteine entsprechend miteinander inkubiert, gekoppelt und analysiert.

In den Proteininkubationsansätzen (Abb. 2.34), konnte in allen Elutionsfraktionen die 45 kDa große Kette des Antikörpers und das an den Antikörper gebundene MoeB detektiert werden.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der 45 kDa Bande in der Fraktion E1 in Abb. 2.34 um den Antikörper oder YnjE handelte, wurde die Bande aus dem Gel eluiert und massenspektroskopisch eindeutig als YnjE identifiziert. Demnach konnte bestätigt werden, dass von den getesteten *E. coli* Rhodanesen nur YnjE an MoeB *in vitro* bindet.

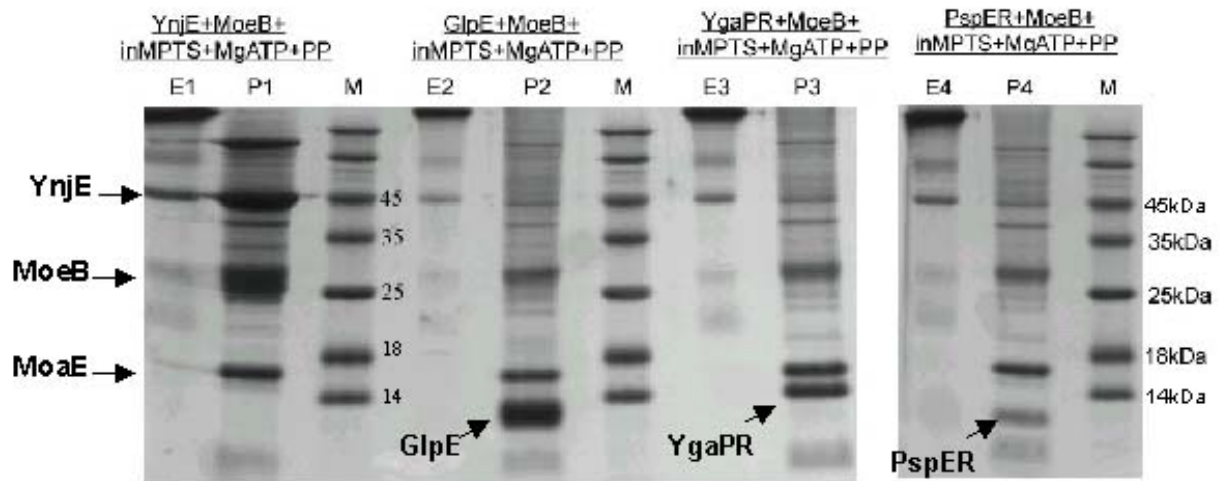


Abb. 2.34 Immunpräzipitation der Rhodanesen-ähnlichen Proteine YnjE, GlpE, YgaPR und PspER mit MoeB und inaktiver MPT-Synthase

Die Rhodanesen YnjE, GlpE, YgaPR und PspER sind mit MoeB, inaktiver MPT-Synthase (inMPTS), MgATP, Pyrophosphatase (PP) und MoeB Antikörper gekoppelten Beads inkubiert und die Elutionsfraktion (E) sowie der Proteinmixansatz (P) auf ein 15 %iges SDS-PAGE aufgetragen worden. Die als YnjE identifizierte 45 kDa Bande in der Elutionsfraktion (E1) bestätigte, dass diese Rhodanese an MoeB gebunden hat.

2.5.6 Identifizierung von *in vivo* Protein-Protein Interaktionen zwischen MoeB und verschiedenen *E. coli* Rhodanesen anhand des Hefe Two-Hybrid Systems

Das Hefe Two-Hybrid System ist ein Testsystem, mit dem Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* detektiert werden können. Das Prinzip beruht auf der Tatsache, dass viele eukaryotische Transkriptionsaktivatoren aus zwei physikalisch trennbaren modulartigen Domänen bestehen. In dieser Untersuchung sollten die *E. coli* Rhodanesen YnjE, GlpE, PspE, YgaP, SseA, YceA und Thil sowie die NifS-ähnlichen Sulfurtransferasen IscS, CSD und CsdB (115,116,142) auf Interaktion mit MoeB getestet werden. Dafür wurde die jeweiligen Nukleotidsequenzen in die Two-Hybrid Vektoren pGADT7 (GAL4-aktivierende Domäne) und pGBKT7 (GAL4-DNA bindende Domäne) kloniert und in den *Saccharomyces cerevisiae* Stamm HF7c transformiert. Kommt es zur Interaktion in der Hefezelle, wird der Transkriptionsfaktor GAL4 funktionell wieder hergestellt und die Expression der *lacZ*- Reportergene initiiert. Die

Interaktion kann anschließend über die Aktivität des gebildeten Enzyms β -Galaktosidase nachgewiesen werden.

Die Transformationsansätze wurden auf SD-Mangelmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin ausplattiert. Somit konnte die erfolgreiche Transformation beider Vektoren (-Leu, -Trp) festgestellt und gleichzeitig auf mögliche Interaktionen durch Anschalten der Reportergene (-His) getestet werden.

Zusätzlich fand eine anschließende Kontrolle der gewachsenen Klone durch den β -Galaktosidase-Filterassay auf Interaktion statt. Das Prinzip dieses Assay beruht darauf, dass das im Puffer vorhandene farblose X-Gal durch aktive β -Galaktosidase gespalten wird und es zu einer Blaufärbung kommt. Die Ergebnisse sind in Tab.2.7 zusammengefasst. Ein leichte Blaufärbung zeigte MoeB mit GlpE, SseA, YceA und CSD sowie YnjE zusammen mit MoaE. Eine starke Färbung war zwischen MoeB mit YnjE, PspE und YgaP, bzw. zwischen YnjE und IscS zu beobachten. Es kam zu keiner Färbung, wenn MoeB im pGADT7 Vektor an die GAL4-aktivierende Domäne fusioniert war.

Der Filterassay bestätigte eindeutig und reproduzierbar, dass es nicht nur zwischen YnjE und MoeB, sondern auch zwischen YnjE und IscS zu einer Protein-Protein-Wechselwirkung kommt.

Tab. 2.7 Getestete Plasmidkombinationen im Two-Hybrid Assay

pGADT7	pGBKT7	Wachstum auf SD –Leu-Trp	Wachstum auf SD –Leu-Trp-His	β-Gal-Filterassay
moeB	glpE	ja	ja	keine Färbung
moeB	sseA	ja	ja	keine Färbung
moeB	yceA	ja	ja	keine Färbung
moeB	pspE	ja	ja	keine Färbung
moeB	ygaP	ja	ja	keine Färbung
moeB	ynjE	ja	ja	keine Färbung
moeB	thil	ja	ja	keine Färbung
moeB	moaE	ja	ja	keine Färbung
moeB	iscS	ja	ja	keine Färbung
moeB	csdB	ja	nein	---
glpE	moeB	ja	ja	leichte Blaufärbung
sseA	moeB	ja	ja	leichte Blaufärbung
yceA	moeB	ja	ja	leichte Blaufärbung
pspE	moeB	ja	ja	Blaufärbung
ynjE	moeB	ja	ja	Blaufärbung
thil	moeB	ja	ja	keine Färbung
ygaP	moeB	ja	ja	Blaufärbung
moaE	moeB	ja	ja	keine Färbung
csdA	moeB	ja	ja	leichte Blaufärbung
moaE	ynjE	ja	ja	leichte Blaufärbung
csdA	ynjE	ja	ja	keine Färbung
ynjE	iscS	ja	ja	Blaufärbung
ynjE	csdB	ja	ja	keine Färbung
ynjE	moaE	ja	ja	leichte Färbung

2.5.6.1 Vergleich der *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen anhand des β-Galaktosidase Liquid Assay

Durch die Interaktion von MoeB mit einer Rhodanese oder Sulfurtransferase wird die Expression der β-Galaktosidase induziert. Aktive β-Galaktosidase hydrolysiert das Substrat ONPG (2-Nitrophenyl-beta-D-galactopyranosid) in D-Galaktose und 2-o-Nitrophenol. Letzteres kann durch einen gelben Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 420 nm photometrisch vermessen werden (Abb. 2.35).

**Abb. 2.35**

Farbumschlag bei aktiver β -Galaktosidase im β -Galaktosidase Liquid Assay

Aktive β -Galaktosidase spaltet das Substrat ONPG in D-Galaktose und 2-o-Nitrophenol. Letzteres konnte anhand des gelben Farbumschlages bei OD_{420nm} photometrisch vermessen und in β -Galaktosidase Units umgerechnet werden.

Bestätigt werden konnte, dass die Proben mit dem an die GAL4-aktivierende Domäne fusioniertem MoeB keine Interaktionen zeigten (Abb. 2.36).

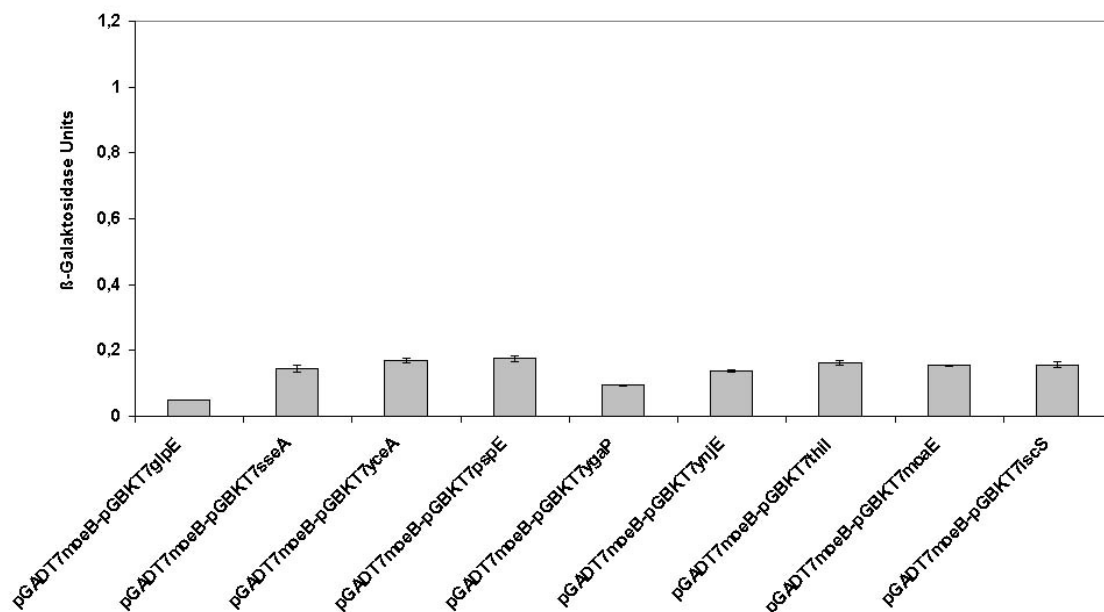


Abb. 2.36 β -Galaktosidase Aktivität mit, an die GAL4-aktivierende Domäne fusioniertem, *moeB*

Fusioniert an die GAL4-aktivierende Domäne (pGADT7) zeigte MoeB nur schwache Interaktionen mit den Rhodanese-ähnlichen Proteinen. Die β -Galaktosidase Aktivität wurde in β -Galaktosidase Units umgerechnet. Ein β -Galaktosidase Unit definiert die Enzymmenge die 1 μ mol ONPG in einer Minute pro Zelle in 2-o-Nitrophenol und D-Galactose hydrolysiert (Miller, 1972; Miller 1992).

Die stärkste Interaktion mit 0,95 β -Gal-U konnte zwischen MoeB und YnjE gemessen werden. Zwischen YgaP, PspE und CSD mit MoeB war eine Aktivität von 0,5 β -Gal-U zu detektieren (Abb.2.37). Dass es zu keinen unspezifischen Interaktionen kam zeigte die Negativkontrolle pGADT*moaE*-pGBKT7*moeB*. Als Positivkontrolle wurden zwei Proteine gewählt deren Interaktion bekannt ist und eine Aktivität von 2,9 β -Gal-U besaßen (Daten nicht gezeigt).

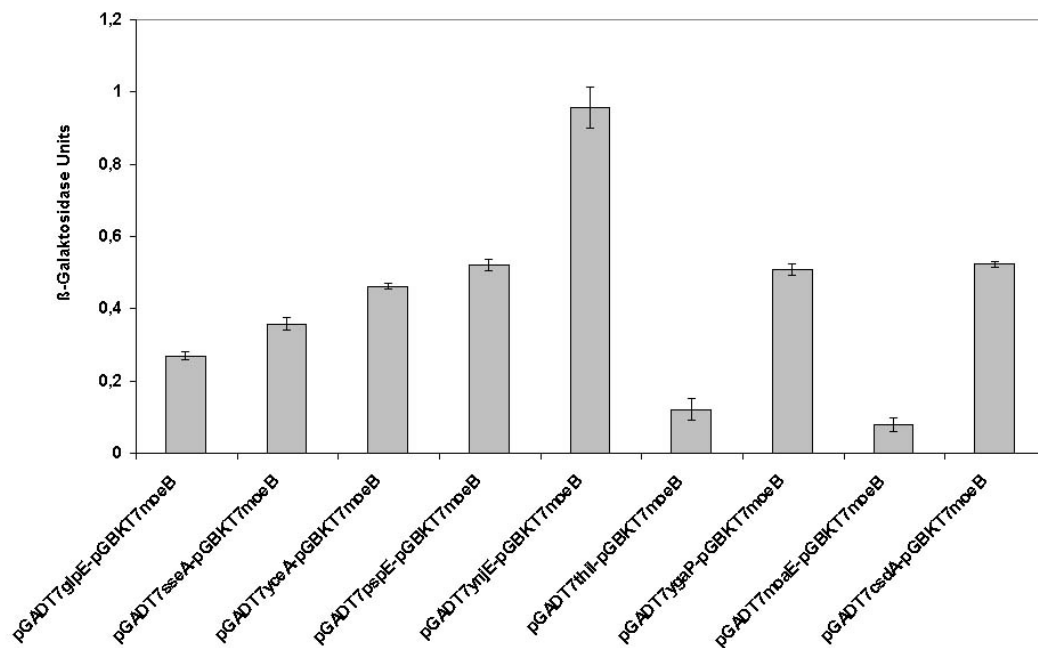


Abb. 2.37 β -Galaktosidase Aktivität mit an die DNA bindende Domäne fusioniertem *moeB*, gegen verschieden Rhodanese-ähnliche Proteine, sowie MoaE und CSD aus *E. coli*

MoeB wurde an die DNA-bindende Domäne (pGBKT7) fusioniert. Die stärkste Interaktion konnte zwischen MoeB und MoeB detektiert werden. Daneben konnten Interaktionen zwischen MoeB und PspE, YgaP und CSD gezeigt werden. Keine Aktivität zeigten MoeB und MoaE. Die gemessenen Absorptionen bei 420 nm wurden in β -Galaktosidase Units umgerechnet.

Da bislang noch keine Schwefelquelle für YnjE identifiziert werden konnte, sollte überprüft werden, ob es zu einer *in vivo* Interaktion zwischen der Rhodanese und den Sulfurtransferasen IscS, CSD und CsdB kommt. Die Kontrollen mit MoaE zeigten keinen Aktivitätsunterschied zwischen den Fusionen von YnjE an die DNA bindende

(pGBKT7) und die GAL4-aktivierende Domäne (pGADT7). YnjE zusammen mit IscS ergab eine Aktivität von 0,866 β -Gal-U (Abb.2.38)

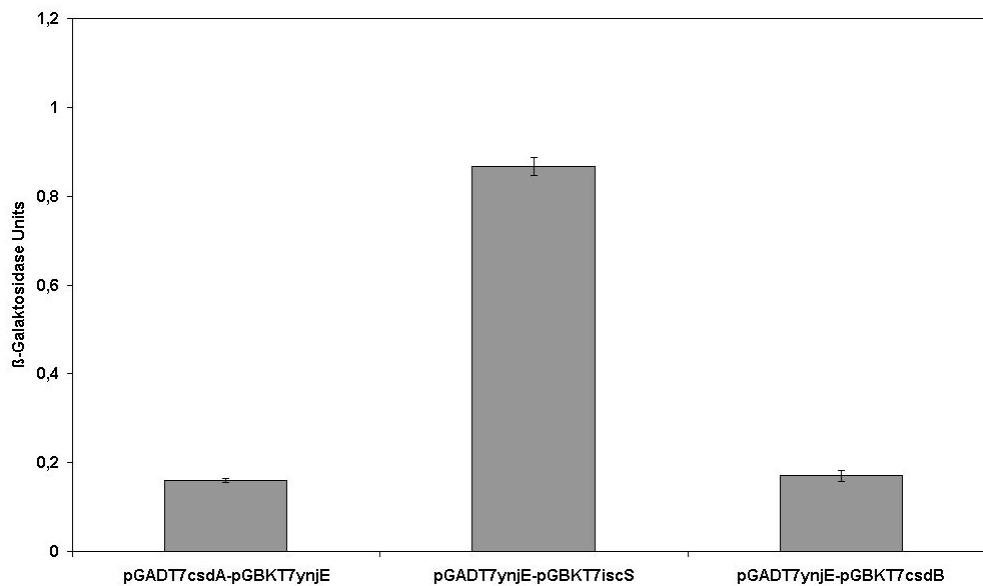


Abb. 2.38 Interaktionsanalyse zwischen YnjE und den *E. coli* Sulfurtransferasen IscS, CSD und CsdB im β -Galaktosidase Assay

Da bislang noch keine Schwefelquelle für YnjE identifiziert werden konnte, wurde die *in vivo* Interaktion zwischen YnjE und den L-Cystein Desulfurasen untersucht. Die höchste Aktivität im β -Galaktosidase Assay zeigte YnjE mit IscS.

Die Messungen im β -Galaktosidase Liquid Assay bestätigten die im Filterassay gezeigten Daten und stellten eindeutig dar, dass die stärkste Interaktion zwischen YnjE und MoeB stattfand.

Gleichzeitig konnte eine bislang noch unbekannte Protein-Protein Wechselwirkung zwischen YnjE und der L-Cystein Desulfurase IscS festgestellt werden, was ein möglicher Hinweis auf die bislang noch unbekannte Schwefelquelle für YnjE sein könnte.

2.5.7 Analyse des Schwefeltransfers von einer L-Cystein Desulfurase auf YnjE

Nachdem im Hefe Two-Hybrid eine Interaktion zwischen YnjE und der *E. coli* L-Cystein Desulfurase IscS gezeigt werden konnte, sollte überprüft werden, ob eine

Schwefelübertragung *in vitro* von IscS auf YnjE stattfindet und die Rhodaneseaktivität dadurch gesteigert werden kann.

Neben IscS sind auch die *E. coli* Sulfurtransferasen CSD und CsdB auf eine mögliche Schwefelübertragung getestet worden. Die Aufreinigung der Sulfurtransferasen fand wie in Ref. 57 beschrieben, statt.

Als Schwefelakzeptor wurde Cyanid eingesetzt, welches bei einer Schwefelübertragung zu Thiocyanat umgewandelt wurde. Durch Zugabe eines Eisen-Nitrat-haltigen Reagenz (Sörbos-Reagenz) bildete sich ein Thiocyanid-Eisen-Komplex der bei einer Wellenlänge von 460 nm photometrisch quantifiziert werden konnte.

Der Versuchsansatz bestand aus je 1 μ M YnjE, 1 μ M Sulfurtransferase, 12 mM L-Cystein und 30 mM KCN. Durch Zugabe des Sörbos-Reagenz wurde die Reaktion zeitabhängig abgestoppt, und die Absorptionen bei 460 nm gemessen.

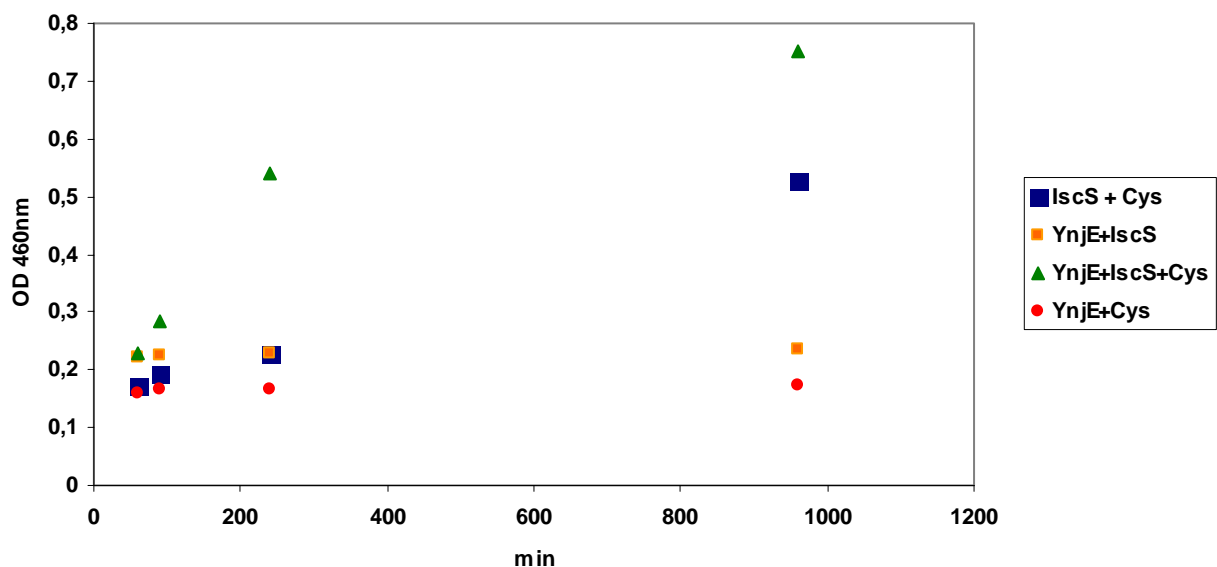


Abb. 2.39 Bestimmung des gebildeten Thiocyanats nach Inkubation von YnjE mit IscS und L-Cystein

1 μ M YnjE und 1 μ M IscS +/- 12 mM Cystein wurden zeitlich unterschiedlich inkubiert und der entstandene Thiocyanat-Eisenkomplex photometrisch bei 460 nm gemessen. Eine gesteigerte Schwefelübertragung von YnjE konnte zusammen mit IscS und L-Cystein gemessen werden.

Die Daten in Abb. 2.39 bestätigten, dass L-Cystein als Schwefelquelle für YnjE nicht in Frage kommt. Auch im Ansatz von YnjE und IscS ohne L-Cystein wurde kein

Thiocyanat gebildet. Das bedeutet, dass weder YnjE noch IscS schwefelbeladen waren.

Im Vergleich zu IscS mit L-Cystein, konnte die Schwefelübertragung durch Zusatz von YnjE in den ersten vier Stunden um das Doppelte gesteigert werden. Nur gering meßbare Aktivitäten waren zwischen YnjE und CSD bzw. CsdB zu beobachten. Anhand des Diagramms von CSD und YnjE kann sogar auf eine Hemmung der Schwefelübertragung geschlossen werden (Abb.2.40).

Zusammenfassend zeigten die Analysen, dass die beste Schwefelübertragung zwischen YnjE, IscS und L-Cystein, erzielt werden konnte.

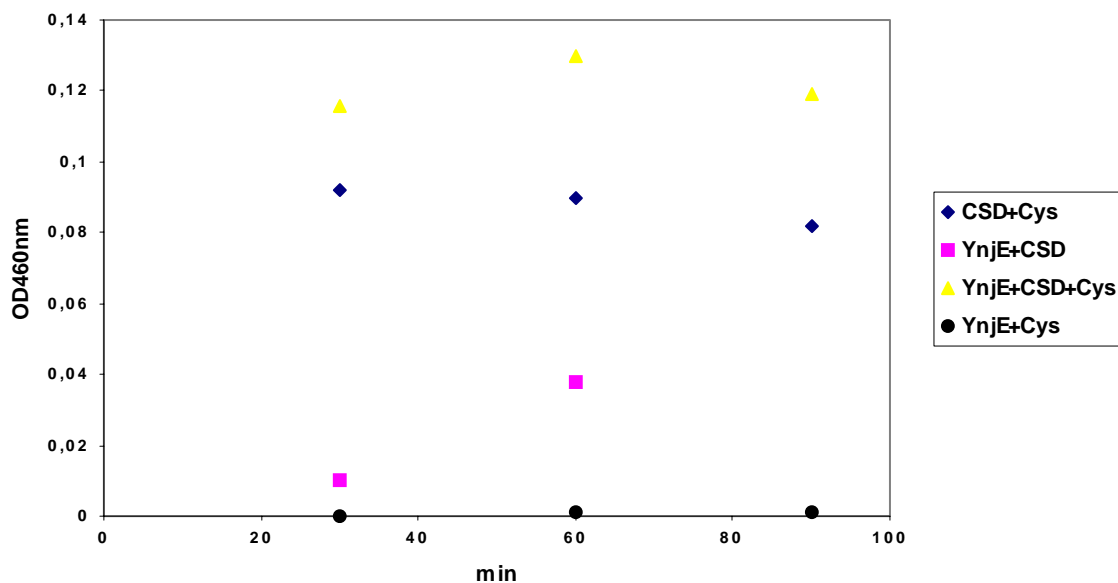


Abb. 2.40 Thiocyanat-Bestimmung nach Inkubation von YnjE mit CSD und L-Cystein

1 μ M YnjE wurde mit 1 μ M CSD +/- L-Cystein inkubiert und die Aktivität bestimmt.

Die niedrigen und mit der Zeit abnehmenden Aktivitäten deuteten auf eine Hemmung zwischen YnjE und CSD hin.

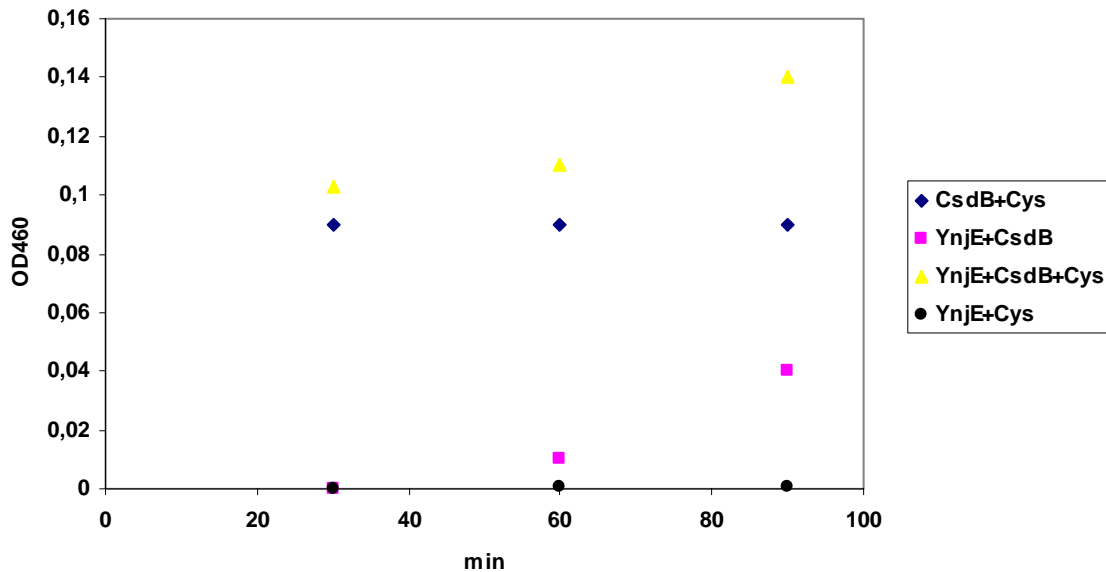


Abb. 2.41 Analyse des gebildeten Thiocyanats nach Inkubation von YnjE mit CsdB und L-Cystein

Je 1 μM der Proteine wurde über 90 Minuten inkubiert und die Schwefelübertragung bestimmt. YnjE mit CsdB und L-Cystein im Ansatz zeigte zwar prinzipiell die höchste Aktivität, lag aber bei einer $\text{OD}_{460\text{nm}}$ von 0,14 unter der von YnjE und IscS in Abb. 2.38.

2.5.8 Analyse der Funktion von YnjE für die *E. coli* Moco-Biosynthese

Ob YnjE im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese involviert ist wurde anhand der *in vitro* Synthese von MPT durch Inkubation von Precursor Z und aktivierter MPT-Synthase (57) überprüft. Dazu sind die gereinigten Proteine, MoeB, inaktive MPT-Synthase, PrecursorZ, IscS und YnjE mit MgATP und L-Cystein, als Schwefelquelle, inkubiert worden. Durch die Aktivierung der inaktiven MPT-Synthase kam es zur Konversion von Precursor Z zu MPT. Anschließend wurde das gebildete MPT durch Zugabe von saurem I_2/KI in das stabile fluoreszierende Oxidationsprodukt, Form A, umgewandelt und chromatographisch an der HPLC quantifiziert (24).

Leimkühler und Rajagopalan (2001) hatten gezeigt, dass IscS alleine *in vitro* den Schwefel von L-Cystein auf Precursor Z übertragen kann (57). Ist YnjE direkt an der Schwefelübertragung auf MoaD beteiligt, sollte die Aktivität von IscS bei geringen IscS-Konzentrationen, durch die YnjE-aktivierte MPT-Synthase gesteigert werden können.

Abb. 2.42 und 2.43 zeigen die Elutionsdiagramme des durch IscS und YnjE gebildeten, und in Form A umgewandelten, MPT. Durch Inkubation mit YnjE konnte

die Aktivität von IscS um 5 % gesteigert werden. Dieser Effekt konnte sowohl bei konstanter YnjE- und variabler IscS-Konzentration als auch umgekehrt erzielt werden. Die höchste Form A Menge ist bei einer Rhodanese- bzw. Sulfurtransferase Konzentration von je 5 μM gemessen worden (Abb.2.43, roter Peak). Zur Kontrolle wurde YnjE mit L-Cystein (Abb. 2.42, 2.43, grüner Peak) und Thiosulfat (Daten nicht gezeigt) als Schwefelquelle auf Aktivität überprüft. In beiden Ansätzen konnte kein Form A detektiert werden. Die Daten zeigten, das YnjE (zusammen mit IscS) einen positiven Effekt auf die MPT-Bildung bzw. die Aktivierung der inaktiven MPT-Synthase durch die Thiocarboxylierung von Moad hat.

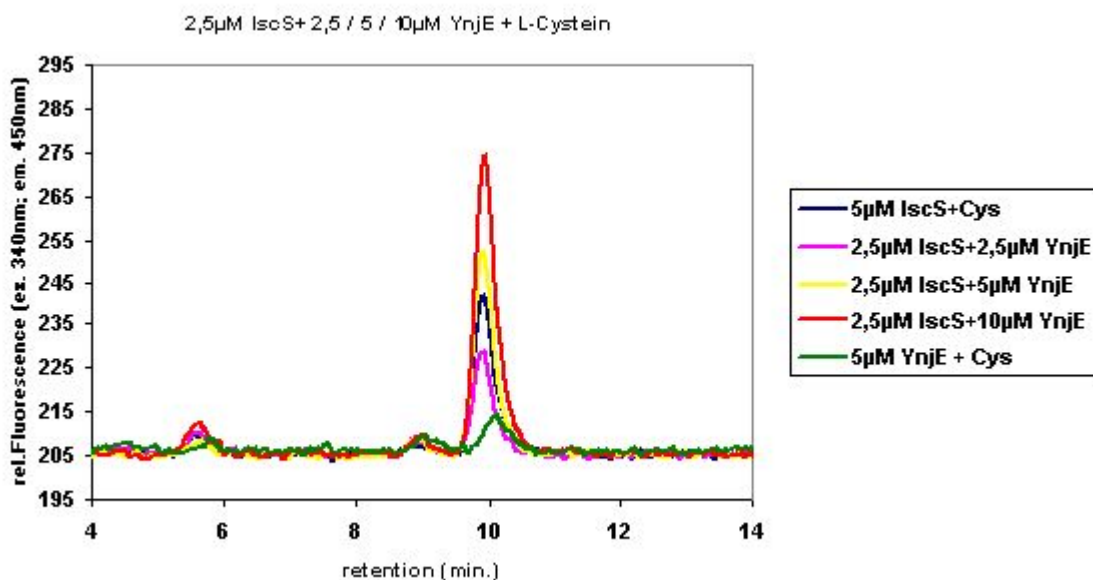


Abb. 2.42 Analyse der Thiocarboxylierung von Moad durch YnjE und IscS anhand der Umwandlung des gebildeten MPT in Form A

5,4 μM inaktive MPT-Synthase, 5,4 μM MoeB, 2,5-10 μM YnjE, 2,5-5 μM IscS, 2,5 mM MgATP, 25 μM L-Cystein und 40 μM Precursor Z wurden inkubiert und das gebildete MPT anhand seines fluoreszierenden Oxidationsproduktes Form A quantifiziert. Form A eluierte bei ca. 10 Minuten. Die steigende YnjE Konzentration bewirkte eine Zunahme der Form A Menge bei konstanter IscS Konzentration.

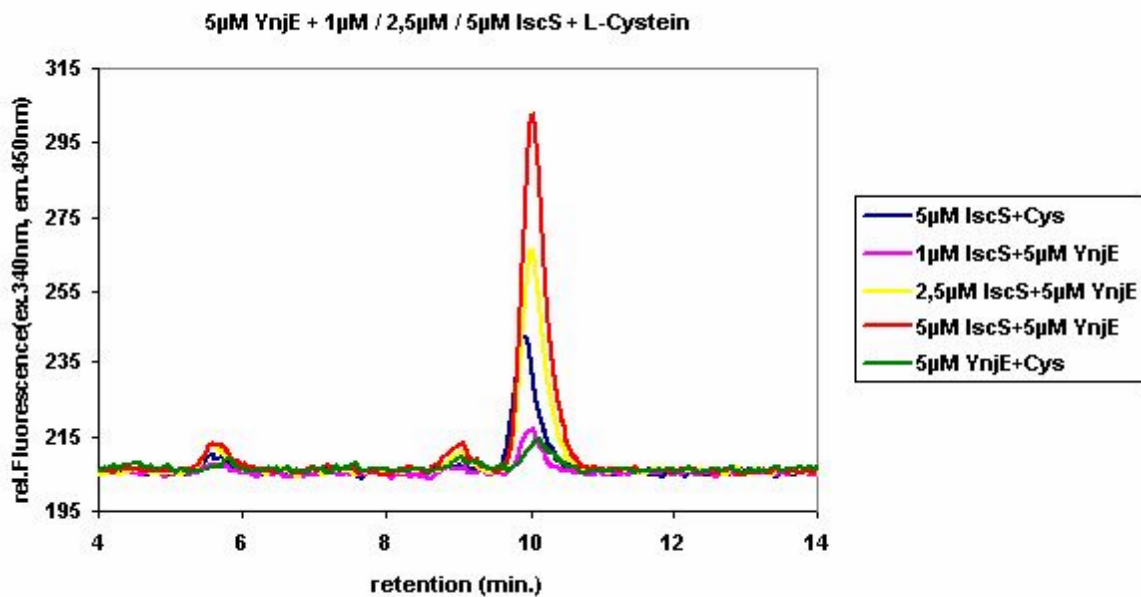


Abb. 2.43 Form A-Bestimmungen nach Inkubation von MoeB, inaktiver MPT-Synthase, Precursor Z, MgATP und L-Cystein mit YnjE und IscS

Dieser Ansatz enthielt neben 5,4 μM inaktive MPT-Synthase, 5,4 μM MoeB, 1-5 μM IscS, 2,5 mM MgATP, 25 μM L-Cystein und 40 μM Precursor Z eine konstante YnjE-Konzentration von 5 μM . Eine Steigerung der Schwefelübertragung von 5 μM IscS um 5 %, konnte nach Inkubation mit 5 μM YnjE erzielt werden.

2.5.9 Massenspektrometrischer Nachweis der Schwefelübertragung von IscS auf YnjE

Die Übertragung des Schwefels von IscS auf YnjE sollte mittels Massenspektrometrie bestätigt werden (Abb. 2.45). Kommt es zur Bindung einer Protein-gebundenen Persulfid-Gruppe, so vergrößert sich das Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins um 32 Da.

Dazu wurden 1 μM IscS und 10 μM YnjE mit 2 mM L-Cystein und 30 mM KCN inkubiert. In der MS-Analyse konnte YnjE sowohl in unbeladener (47379,9 Da) als auch in beladener (47411,1 Da) Form gezeigt werden (Abb. 2.45). IscS (45089 Da) wurde nicht detektiert da es in zu geringer Konzentration eingesetzt wurde.

Die in der MS-Analyse eindeutig bestimmte Masse von 47379 Da des unbeladenen YnjE-Proteins war um 1359 Da kleiner als die, anhand der Sequenz berechneten Größe von 48738 Da.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass am N-Terminus von YnjE eine periplasmatische Erkennungssequenz von 28 Aminosäuren abgespalten wurde und das Protein dadurch eine Größe von 47379 Da hat. Somit stimmten die gemessenen Werte mit den theoretischen überein, wenn man Abweichungen von ca. 5 Da im Bereich des Messfehlers berücksichtigte.

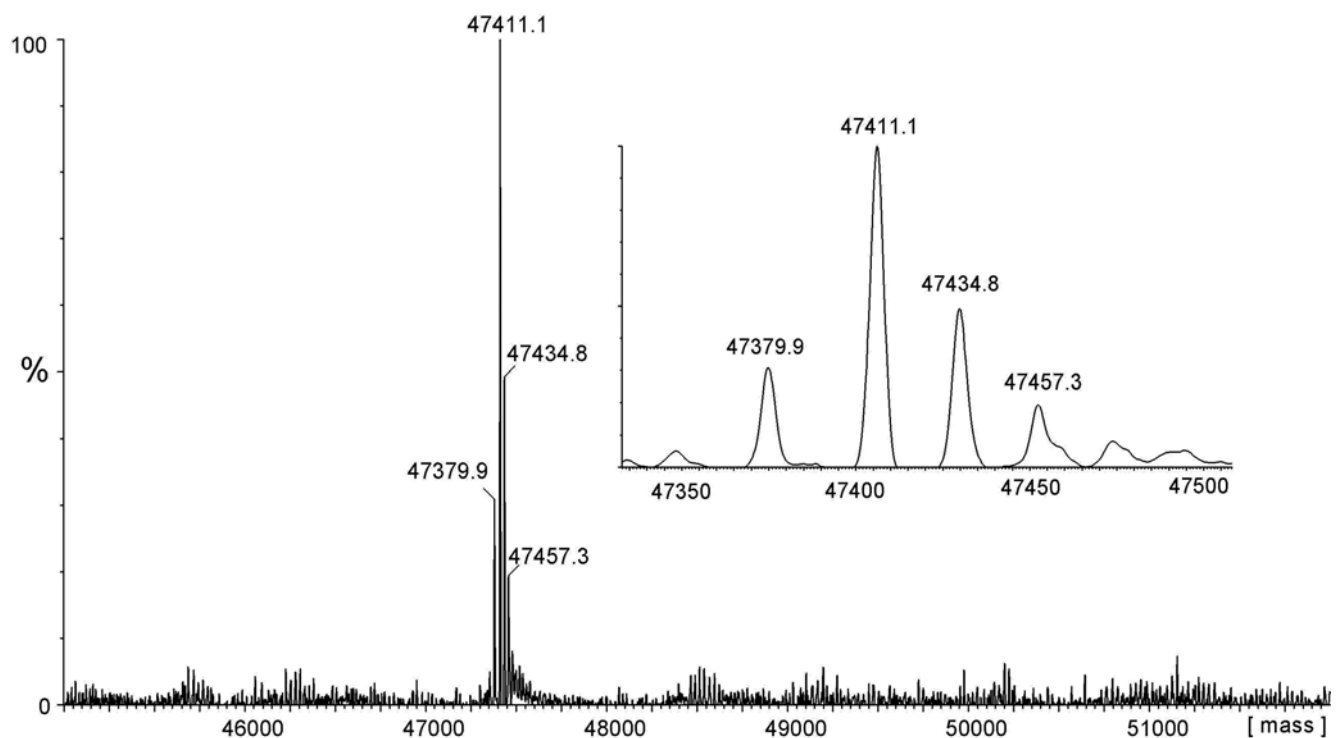


Abb. 2.45 Massenspektrometrische Untersuchung des schwefelbeladenen YnjE

Das MALDI Spektrum zeigt das unbeladene (47379 Da) und das schwefelbeladene (47411 Da) YnjE. Durch die bestätigte N-terminale Deletion kam es zu einer Abweichung von 1363 Da zwischen der gemessenen und der theoretisch berechneten Masse.

3. Diskussion

3.1 Sind die L-Cystein Desulfurasen CSD und CsdB an der *in vivo* MPT-Synthese in *E. coli* beteiligt?

Die *E. coli* Cystein-Desulfurasen IscS, CSD und CsdB katalysieren den Schwefeltransfer von L-Cystein zu L-Alanin über eine Protein-gebundene Persulfidbindung an einem konservierten Cysteinrest im Protein. Cystein-Desulfurasen sind an der Schwefelmobilisierung für verschiedene Biosynthese-Wege verantwortlich, wie z.B. IscS in der Thiaminbiosynthese, 4-Thiouridin-Biosynthese und Synthese von Fe-S-Clustern (107) sowie CsdB in der Reparatur von oxidativ beschädigten Fe-S-Clustern (113). Leimkühler und Rajagopalan zeigten 2001, dass jede der drei in *E. coli* vorkommenden L-Cystein Desulfurasen IscS, CSD und CsdB eine carboxylierte MPT-Synthase *in vitro* sulfurieren können und dass, in einem *E. coli* *iscS*-Mutantenstamm, exprimierte Molybdoenzyme in aktiver Form vorlagen (57). Anhand von *E. coli* Mutantenstämmen in *csdA* und *csdB*, sowie einer *csdA/csdB* Doppelmutante wurde *in vivo* untersucht, ob CSD oder CsdB an der Schwefelübertragung und der Bildung von MPT beteiligt sind.

Die heterolog exprimierte humane Sulfitoxidase konnte in den drei *E. coli* Mutantenstämmen MC1061(*csdA*), MC1061(*csdB*) und MC1061(*csdA/csdB*) in aktiver Form gereinigt werden. Die niedrige Enzymaktivität der gereinigten Sulfitoxidase aus der *iscS*-Mutante basiert auf der beeinträchtigten Aktivität von MoaA, einem Eisen-Schwefel-Cluster-haltigen Protein, dass in der Precursor Z-Synthese involviert ist (43).

Demnach ist keine der *E. coli* L-Cystein Desulfurasen IscS, CSD und CsdB essentiell für die *in vivo* Sulfurierung der MPT-Synthase verantwortlich. Es besteht aber die Möglichkeit, dass andere Persulfid-enthaltende Proteine, auf funktionell ähnliche Weise, spezifisch in der MPT-Synthase Aktivierung involviert sind.

3.2 Funktionelle und strukturelle Unterschiede der *E. coli* Einzeldomänen-Rhodanesen GlpE, PspER und YgaPR

In *E. coli* wurden bis heute drei Einzeldomänen-Rhodanesen, GlpE, PspE und YgaP, identifiziert. Von YgaP war nur bekannt, dass es sich dabei um eine 18 kDa große Rhodanese mit einer C-terminalen Transmembranregion handelt. Aufgrund dessen sollte YgaPR in Hinblick auf GlpE und PspER näher charakterisiert werden. Da es nicht möglich war, YgaP mit seiner C-terminalen Transmembran-Domäne aufzureinigen, wurde diese abgespalten und die Untersuchungen an der 14 kDa YgaP-Rhodanesedomäne (YgaPR) durchgeführt. Generell ist die Aufreinigung integraler Membranproteine schwierig und stellt bis heute eine große Herausforderung an die Isolierungs- und Reinigungstechniken dar.

Die Bestimmung der Persulfurierungsrate durch Fluoreszenz-Quenching zeigte, dass GlpE zu 40,25 %, PspER zu 38,9 % und YgaPR zu 10 % schwefelbeladen aus *E. coli* aufgereinigt werden konnte. Ein Grund für die niedrige Schwefelbeladung von YgaPR, im Vergleich zu GlpE und PspER, könnten die Aufreinigungsbedingungen sein, oder aber, dass durch die fehlende C-terminale Transmembranregion das Protein nicht optimal gefaltet wird und die Persulfurierung des Proteins nur eingeschränkt stattfinden kann.

Anhand analytischer Gelfiltration konnte gezeigt werden, dass YgaPR und PspER in Lösung als Monomer vorliegen. Das ist in sofern ungewöhnlich, da GlpE unter nativen Bedingungen als Dimer vorliegt (83). Eine Erklärung für das Monomer-Laufverhalten von YgaPR und PspER könnte wieder die fehlende Signalsequenz sein, oder aber die kleine Proteingröße der beiden Einzeldomänen-Rhodanesen. Letzteres würde durch die Tatsache bestätigt werden, dass GlpE in der analytischen Gelfiltration dieser Arbeit ebenfalls ein verändertes Laufverhalten gezeigt hat.

Im Enzymassay konnte für YgaPR eine Thiosulfat-Sulfurtransferase Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings war die katalytische Aktivität von YgaPR im Vergleich zu GlpE und PspER, mit Cyanid als Schwefelakzeptor, um das 130 fache bzw. 45 fache niedriger. Mit DTT als Schwefelakzeptor wurde die YgaPR Aktivität lediglich um das 1,3 fache gesteigert. Für diese geringe Aktivität kann es verschiedene Gründe geben. YgaPR kann z.B. ohne seine Transmembran-Domäne in einer nicht optimal gefalteten Konformationsstruktur vorliegen. Die Tatsache, dass die Aktivität durch DTT als Schwefelakzeptor etwas gesteigert werden konnte, zeigt,

dass die geringe Enzymaktivität auch am Cyanid oder DTT liegen kann. Es ist aber auch möglich, dass Thiosulfat nicht das physiologische Substrat ist und der Schwefel entweder von einer anderen niedermolekularen Substanz oder einem weiteren schwefelübertragenden Protein stammt. Ein Hinweis dafür kann das katalytische Sequenzmotiv ⁶⁴CQAGKR⁶⁹ von YgaPR sein. Bei allen bislang bekannten Thiosulfat-Sulfurtransferasen ist im katalytischen Sequenzmotiv (6 Aminosäuren) an erster Stelle ein Cystein und an vierter Stelle ein Glycin konserviert. An Position zwei und drei sind oft positiv geladene Aminosäuren, wie zum Beispiel Lysin und Asparagin in der *Bos taurus* Rhodanese, zu finden. Ploegmann *et al.* postulieren für diese beiden Aminosäuren (an Position zwei und drei) eine wichtige Rolle in der spezifischen Substraterkennung (81,146). Der katalytische Loop von YgaPR besitzt an zweiter Position ein ungeladenes polares Glutamin und an dritter Position ein unpolares Alanin. Dass jedoch durch Thiosulfat ein Persulfid am katalytischen Cystein von YgaPR ausgebildet wird, konnte durch die Konformationsänderung in der CD-spektroskopischen Analyse bestätigt werden. Auch bei GlpE und PspER sind Änderungen der Sekundärstruktur durch Thiosulfatinkubation beobachtet worden. Neben der Persulfidausbildung konnte in der CD-Spektroskopie ein eindeutiger Unterschied zwischen der Sekundärstruktur von YgaPR und GlpE bzw. PspER gezeigt werden, wobei GlpE und PspER strukturell kaum voneinander zu unterscheiden waren.

Zusammenfassend lassen die Untersuchungen der drei *E. coli* Einzeldomänen-Rhodanesen vermuten, dass es nicht nur strukturelle sondern auch funktionelle Unterschiede zwischen YgaPR und GlpE bzw. PspER gibt, was nicht zuletzt an dem bislang einzigartigen katalytischen Sequenzmotiv von YgaPR liegen kann.

3.3 Ist eine Rhodanese an der *in vivo* Aktivierung der *E. coli* MPT-Synthase involviert?

Es wurde getestet, ob die *E. coli* Rhodanesen GlpE und Thil an der Thiocarboxylierung der MPT-Synthase *in vitro* beteiligt sind. Beide Rhodanesen konnten den Schwefel von Thiosulfat über eine Persulfidbindung am katalytischen Cystein auf die kleine Untereinheit Moad übertragen. Somit können nicht nur die L-Cystein Desulfurasen IscS, CSD und CsdB, sondern auch die getesteten *E. coli* Rhodanesen *in vitro* die carboxylierte MPT-Synthase aktivieren. Das bedeutet, dass

die Bedingungen der *in vitro* Schwefelübertragung und MPT-Synthese unspezifisch sind und der Schwefel von jedem Persulfid-enthaltenem Protein in diesem System übertragen werden kann.

In vivo Analysen von *E. coli* Mutantenstämmen mit Mutationen in jeweils sieben Rhodanesegenen (außer *thil* bzw. *ybbB*) bestätigten, dass keine der bislang identifizierten Rhodanesen als spezifischer Schwefeldonor in der Moco-Biosynthese fungiert. In beiden Stämmen konnte aktive Nitratreduktase detektiert werden.

Bei der Schwefelübertragung auf die MPT-Synthase in *E. coli* scheint es sich um ein Zusammenspiel verschiedener Sulfurasen zu handeln, die sich gegenseitig bei einem Defekt ersetzen können. Dieser Mechanismus hat zum Vorteil, dass eine Thiocarboxylierung der MPT-Synthase zu jeder Zeit gewährleistet ist. Aufgrund dessen lassen sich folgende Modelle für den Schwefeltransfer im zweiten Schritt der *E. coli* Moco-Biosynthese beschreiben: (1) Eine der drei L-Cystein Desulfurasen IscS, CSD oder CsdB fungiert als Schwefelüberträger von L-Cystein auf die MPT-Synthase; kommt es zum Ausfall einer oder zwei Sulfurtransferasen übernimmt die übrig gebliebene L-Cystein Desulfurase diese Funktion. (2) Eine der acht *E. coli* Rhodanesen (SseA, YceA, PspE, YnjE, GlpE, YbbB, Thil) thiocarboxyliert die kleine Untereinheit MoaD indem Thiosulfat als Schwefeldonor dient. Sind bis zu sieben Rhodanesegene mutiert, kann entweder das achte Rhodanese-ähnliche Protein oder aber eine der L-Cystein Desulfurasen den Defekt kompensieren. (3) Eine der drei NifS-ähnlichen L-Cystein Desulfurasen IscS, CSD oder CsdB transportiert den aus L-Cystein mobilisierten Schwefel auf eines der acht Rhodanese-ähnlichen Proteine, welches wiederum den Schwefel zur Aktivierung der MPT-Synthase auf MoaD überträgt. (4) Ein bislang nicht identifiziertes Protein ist spezifisch für den Schwefeltransfer in der Moco-Biosynthese involviert.

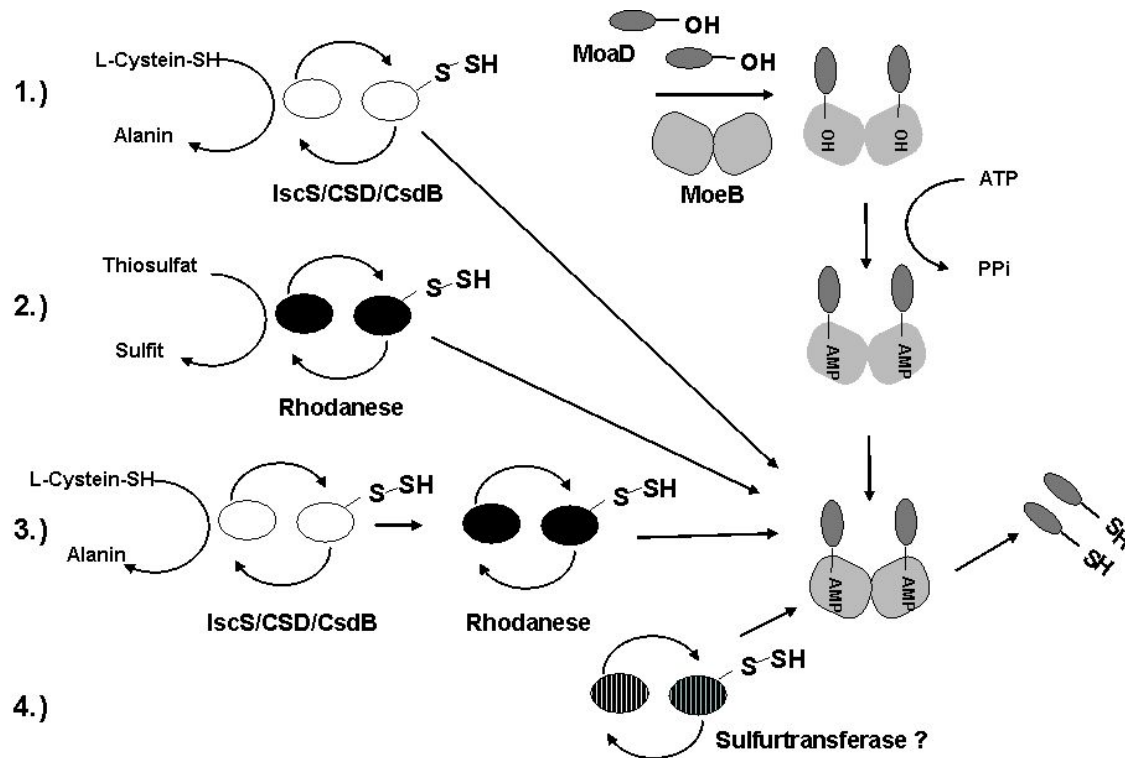


Abb. 3.1 Modell für den Schwefeltransfer zur Thiocarboxylierung der kleinen MPT-Synthase Untereinheit Moad in der *E. coli* Moco-Biosynthese

(1) Schwefelübertragung durch die *E. coli* L-Cystein Desulfurasen IscS, CSD oder CsdB aus L-Cystein (2) Ein *E. coli* Rhodanese-ähnliches Protein mobilisiert den Schwefel aus Thiosulfat zur Aktivierung von Moad (3). Der Schwefel wird aus L-Cystein von einer der Sulfurtransferasen IscS, CSD oder CsdB auf ein Rhodanese-ähnliches Protein transportiert, um anschließend von der Rhodanese auf Moad übertragen zu werden (4) Eine bislang unbekannte spezifische Sulfurtransferase ist in die Thiocarboxylierung von Moad involviert.

3.4 *In vivo* Interaktionspartner von MoeB und Moad im eukaryotischen Tri-Hybrid System

Im Hefe Tri-Hybrid System wurden sowohl MoeB als auch Moad als Köder- bzw. Brückenprotein eingesetzt aufgrund der Annahme, dass eine Schwefelübertragung nur stattfindet wenn Moad und MoeB als Adenylatkomplex vorliegen.

Ein Vorteil der Tri-Hybrid Methode ist, dass die Proteine nicht überexprimiert werden, sondern unter nativen Bedingungen in der Zelle vorliegen. Die kalkulierte Transformationseffizienz von $1,3 \times 10^6$ gewährleistete, dass jedes Gen der *E. coli*

DNA-Bank mindestens einmal mit dem pBridge Konstrukt in der Hefezelle vorlag. Die Selektionen auf höchster Stringenz (SD -Leu, -Trp, -His, -Ade, -Met) ergab eine Anzahl von 40 Klonen. Obwohl die Selektion bei höchster Stringenz nur starke Protein-Protein-Interaktionen zulässt, konnte keiner der identifizierten Klone mit der Häufigkeit einer spezifischen Interaktion gefunden werden. Jedoch kann es sich natürlich auch bei nur einem gefundenen Klon um eine Interaktion handeln.

Es wurde kein Protein identifiziert, welches offensichtlich in funktionelle Verbindung mit dem Schwefeltransfer gebracht werden kann. Die einzigen Proteine, die in einen Bezug zum zweiten Schritt der Moco-Biosynthese gebracht werden können, sind YeeF und CycA. YeeF wird als hypothetisches Aminosäure-Transportprotein beschrieben; CycA ist als β -Alanin-Transporter beschrieben, welches die aktive Aufnahme von β -Alanin in *E. coli* katalysiert, aber auch als sekundärer Transporter in der Aufnahme von L-Alanin, D-Alanin, Glycin, D-Serin und D-Cycloserin involviert ist (143,144). Demnach wäre es möglich, dass eines dieser beiden identifizierten Proteine auch an dem Transport von L-Cystein beteiligt sein könnte.

Es ist zu bemerken, dass in dem Tri-Hybrid Screen keine Interaktionen mit anderen in der Moco-Biosynthese involvierten Proteine wie z.B. MoaE festgestellt werden konnten. Das bedeutet, dass die Tri-Hybrid *in vivo* Analyse von vielen Faktoren abhängig ist und negativ beeinflusst werden kann, so dass selbst bekannte Proteininteraktionen oft nicht detektiert werden. Eine zusätzliche Schwierigkeit stellt die Tatsache dar, dass in dieser Arbeit Interaktionen zwischen prokaryotischen Proteinen in einem eukaryotischem System untersucht wurden. Aufgrund dessen könnten in der Hefezelle mögliche essentielle Proteinmodifizierungen (z.B. Glykosylierung oder Phosphorylierung) nicht stattfinden, was eine Protein-Protein-Interaktion verhindert, zumal *S. cerevisiae* der bislang einzige bekannte Organismus ist, der über keine Moco-Biosynthese verfügt. Ebenfalls zu keiner Interaktion kommt es, wenn ein Protein nicht im Kern exprimiert bzw. aus diesem heraustransportiert wird, da eine Aktivierung der Transkriptionsgene generell nur stattfinden kann, wenn die interagierenden Proteine im Hefe-Zellkern exprimiert werden bzw. dort miteinander in Kontakt treten.

3.5 Identifizierung der *E. coli* Rhodanese YnjE in der TAP-Methode

Um auszuschließen, dass Protein-Interaktionen von MoeB/MoaD durch die Expression im eukaryotischen System behindert wurde, ist die TAP-Methode in *E. coli* angewendet worden. Diese Methode ermöglicht es, Protein-Komplexe zu identifizieren und aufzureinigen. Dabei wird das Köderprotein unter nativen Bedingungen in *E. coli* exprimiert. MoeB ist an N-terminalen TAP-Tag fusioniert und in verschiedenen *E. coli* Mutantenstämmen exprimiert worden. Dass der fusionierte TAP-Tag *in vivo* keine Auswirkungen auf die Proteinaktivität von MoeB hat, zeigte die positive Komplementation des *E. coli moeB*(DE3)-Mutantenstammes durch TAP*moeB*. Die Aufreinigung und Identifizierung des Interaktions-Komplexes aus endogenem und TAP-fusioniertem MoeB bestätigte die Funktion dieser Methode, da MoeB unter nativen Bedingungen als Dimer vorliegt (70). Die Aufreinigung und Identifizierung von Proteinkomplexen konnte nur durch Expression des TAP*moeB* Konstruktes in der *E. coli iscS*-Mutante erreicht werden. Die *E. coli moeB*(DE3)-Mutante enthält eine Punktmutation im *moeB* Gen, wodurch *moeB* zwar noch transkribiert wird, jedoch inaktiv vorliegt. Aufgrund dessen könnte bei der Expression von TAP*moeB* in der *moeB*(DE3)-Mutante das inaktive endogene MoeB an das TAP-MoeB-Fusionsprotein binden, wodurch weitere Interaktionen behindert wurden. Die Aufreinigung der Proteinkomplexe beruht auf zwei Affinitätsschritten. Die Waschschriffe zwischen den Affinitätssäulen wurden so gewählt, dass unspezifische Interaktionen vermieden wurden. In allen TAP*moeB*-Analysen in der *iscS*-Mutante konnte das endogene MoeB detektiert werden. Die aufgereinigten, mit TAP-MoeB interagierenden, Proteine wurden auf ein SDS-PAGE aufgetragen, aus dem Gel eluiert, tryptisch verdaut und durch Massenspektrometrie identifiziert. In drei von fünf Aufreinigungen zeigten zwei 48 kDa große und ein 20 kDa großes Proteinfsegment Homologien zu der *E. coli* Thiosulfat-Sulfurtransferase YnjE. Auffällig war, dass die *E. coli* Datenbank-Peptidanalyse dieser drei eluierten Gelbanden an erster Stelle immer die MoeB-Proteinsequenz identifizierte. Anhand der Proteingrößen von MoeB (26 kDa) und YnjE (48 kDa) musste es sich dabei um eine Interaktion zwischen den Proteinen bzw. um Abbauprodukte handeln. Die anschließende ESI-MS-Analyse der 20 kDa Bande konnte kein YnjE detektieren, was darauf schließen lässt, dass das Protein in zu niedriger Konzentration vorlag oder aber schon vollständig abgebaut wurde. Eine schnelle Protein-Degradation würde auch erklären, warum in den

anderen zwei TAP-Analysen kein YnjE nachgewiesen werden konnte. Ein weiterer Grund könnten auch etwas verlängerte Waschschriffe oder minimal abweichende Pufferbedingungen sein, die die Interaktion von MoeB und YnjE bzw. die Aufreinigung gestört haben.

Die Tatsache, dass die Interaktion von MoeB und YnjE in der *E. coli iscS*-Mutante identifiziert wurde, kann darauf hinweisen, dass beim Ausfall der L-Cystein Desulfurase IscS *in vivo* die Expression anderer Sulfurtransferasen hochreguliert wird, um diesen Defekt zu beheben. Die *E. coli* Thiosulfat-Sulfurtransferase YnjE gehört zu den acht bekannten *E. coli* Rhodanese-ähnlichen Proteinen, über dessen Funktion bislang nichts bekannt war. Da es sich um ein Persulfid-bindendes *E. coli* Protein handelte, das anhand von *in vivo* Interaktion mit MoeB co-gereinigt und identifiziert wurde, könnte YnjE in der Sulfurierung der kleinen MPT-Synthase Untereinheit Moad involviert sein.

3.6 Charakterisierung der *E. coli* Rhodanese YnjE

Die *in vivo* Interaktion von YnjE und MoeB konnte durch die zusätzliche TAP-Analyse, in der YnjE und TAP-MoeB co-exprimiert wurden, eindeutig bestätigt werden. Um unspezifische Interaktionen durch das überexprimierte YnjE auszuschließen, wurden die Waschfraktionen im SDS-PAGE kontrolliert, bis kein Protein mehr zu detektieren war.

Zur biochemischen Charakterisierung von YnjE wurde das Protein heterolog exprimiert und aufgereinigt. Nach der Gelfiltrationsreinigung konnte neben YnjE eine zusätzliche ca. 25 kDa große Proteinbande im SDS-PAGE detektiert werden, wobei es sich um co-gereinigtes MoeB handeln könnte. Dies könnte z.B. durch ESI-MS-Analysen bestätigt werden.

3.6.1 Sulfurtransferase-Aktivität von YnjE

Das „active site loops“ Motiv von YnjE kann, nach Bordo & Bork (99), nicht eindeutig einer Thiosulfat:Cyanid Sulfurtransferase oder 3-Mercaptopyruvat:Cyanid Sulfurtransferase zugeordnet werden (Abb.3.2).

YnjE	-	C	G	T	G	W	R	-
Thiosulfat:Cyanid Sulfurtransferase	-	C	R	X	G	X	{R/T}	-
3-Mercaptopyruvat:Cyanid Sulfurtransferase	-	C	G	{S/T}	G	V	T	-

Abb. 3.2 Vergleich der „active site loop“ Motive von YnjE, einer Thiosulfat:Cyanid Sulfurtransferase und einer 3-Mercaptopyruvat:Cyanid Sulfurtransferase (nach Bordo & Bork (99))

Das „active site loops“ Motiv von YnjE kann, nach Bordo & Bork, nicht eindeutig einer Thiosulfat:Cyanid Sulfurtransferase oder 3-Mercaptopyruvat:Cyanid Sulfurtransferase zugeordnet werden.

Im Sörbos-Assay wurde weder durch L-Cystein, Thiosulfat oder 3-Mercaptopyruvat eine *in vitro* Sulfurtransferase-Aktivität für YnjE ermittelt. Ein Grund dafür kann der falsche Schwefel-Akzeptor Cyanid sein. Daneben besteht die Möglichkeit, dass keine der getesteten Schwefelquellen das physiologische Substrat des Proteins darstellt und der Schwefel entweder von einer anderen niedermolekularen Substanz oder einem weiteren schwefelübertragenden Protein stammt. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass durch den C-terminal fusionierten His-Tag die Funktion des Rhodanese-ähnlichen YnjE beeinträchtigt ist. So konnten Kramer *et al.* beobachten, dass bereits ein am C-Terminus zusätzlich angehängter Serinrest die Aktivität und Proteinstabilität der *Bos taurus* Rhodanese negativ beeinflusst (145).

Da eine Persulfidbindung durch Thiosulfat anhand der Sekundärstruktur-Konformationsänderung CD-spektrophotometrisch bestätigt wurde, scheint die *in vitro* Inaktivität von YnjE durch die C-terminale Extension begründet zu sein.

3.6.2 YnjE interagiert *in vitro* mit MoeB und MoaE

Da in der *in vitro* MPT-Synthese jedes Persulfid-enthaltene Protein in der Lage war, die MPT-Synthase zu aktivieren, stellte sich die Frage, ob nicht nur YnjE, sondern auch ein anderes Rhodanese-ähnliches Protein mit MoeB *in vitro* interagiert. Durch die Inkubation der *E. coli* Rhodanesen GlpE, PspER, YgaPR und YnjE mit MoeB konnte diese Annahme allerdings widerlegt werden. Eine eindeutige Wechselwirkung konnte nur zwischen MoeB und YnjE beobachtet werden. Auch *in vivo* zeigte MoeB die größte Bindungsaffinität zu YnjE.

Was die Interaktion von YnjE und MoeB für Auswirkungen auf die inaktive MPT-Synthase hat, wurde in *in vitro* Assemblierungsversuchen untersucht. Wie bereits von Leimkühler *et al.* beschrieben, löste sich die kleine Untereinheit MoaD von der großen Untereinheit MoaE, um an MoeB zu binden und durch Anwesenheit von MgATP einen Adenylatkomplex auszubilden (70). Überraschend war die Beobachtung einer 30 kDa Bande in den MoeB-MoaD-Fractionen, sowie die Tatsache, dass YnjE zusammen mit MoaE detektiert werden konnte. Da die 30 kDa-Bande durch eine Immunoblot-Analyse mit einem monoklonalen His-tag Antikörper als YnjE identifiziert wurde, musste es sich also um den C-terminalen Bereich von YnjE handeln. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass nicht nur YnjE und MoeB, sondern auch YnjE und MoaE miteinander interagieren. Dabei scheint es zu Konformationsänderungen von YnjE zu kommen, indem die N-terminale Domäne abgespalten wird.

Für den zweiten Schritt der *E. coli* Moco-Biosynthese würde das bedeuten, dass während der Schwefelübertragung ein Enzymkomplex aus MoeB, MoaD, MoaE und YnjE ausgebildet wird. Dabei bildet die Rhodanese eine Art Bindeglied zwischen MoeB und MoaE aus (Abb.3.3). Das carboxylierte MoaD löst sich von MoaE, bindet an MoeB und wird adenyliert. Das an MoeB gebundene YnjE kann den Schwefel auf MoaD übertragen, während es gleichzeitig MoaE „festhält“. Das hätte zum Vorteil, dass das thiocarboxylierte MoaD sofort wieder an MoaE binden kann und die MPT-Synthase aktiviert ist.

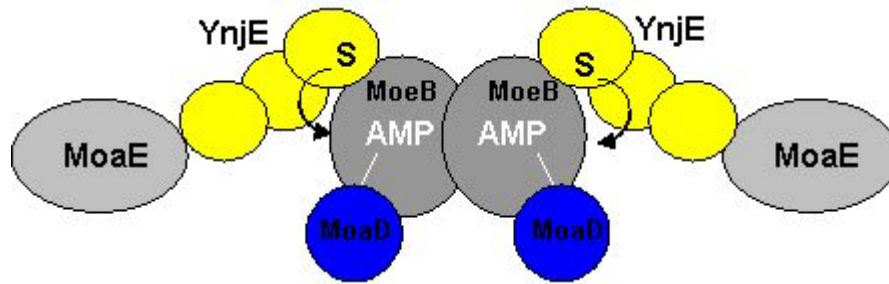


Abb. 3.3 Modell der Interaktion von MoeB, MoaE, MoaD und YnjE

YnjE fungiert als Bindeglied zwischen dem Adenylatkomplex MoeB-MoaD und der großen MPT-Synthase Untereinheit MoaE.

3.6.3 Überträgt IscS den Schwefel auf YnjE?

Durch Two-Hybrid-Analysen wurde auch *in vivo* bestätigt, dass MoeB die größte Interaktionsaffinität zu YnjE hat. Es konnten nur Interaktionen gemessen werden, wenn MoeB an die DNA-bindende Domäne fusioniert vorlag. Das bedeutet, dass die fusionierte DNA-bindende oder aktivierende Domäne negative Auswirkungen auf die Proteinaktivität haben kann, indem es z.B. zu strukturellen Konformationsänderungen kommt, die eine Interaktion verhindern.

In der *in vivo* Interaktionsanalyse konnte eine bislang unbekannte Interaktion zwischen YnjE und IscS beobachtet werden. Bereits für die *E. coli* Thiamin- und 4-Thiouridinebiosynthese war bekannt, dass die Sulfurtransferase IscS den aus L-Cystein mobilisierten Schwefel über eine Persulfidbindung auf die Rhodanese-ähnliche Domäne von ThiI überträgt (107). Da für YnjE bislang keine Schwefelquelle identifiziert werden konnte, sollte untersucht werden, ob IscS in der Persulfurierung von YnjE involviert ist. Die Sulfurtransferase-Aktivität von unbeladenem YnjE wurde tatsächlich durch Inkubation mit IscS und L-Cystein als Schwefelquelle gesteigert. Keinen Einfluss auf die Rhodaneseaktivität von YnjE hatten die *E. coli* L-Cystein Desulfurasen CSD und CsdB. Demnach scheint es sich um einen spezifischen Schwefeltransfer von IscS auf YnjE zu handeln, wobei L-Cystein als bislang postulierten Schwefeldonor (57) bestätigt werden kann.

Zum detaillierten Nachweis, ob YnjE durch IscS persulfuriert wird, wurde die unbeladene Rhodanese YnjE mit IscS und L-Cystein inkubiert und massenspektrometrisch analysiert. In der Massenspektrometrie kann die exakte Masse eines Proteins bestimmt werden. Das bedeutet, dass, wenn es zur Bindung

einer Persulfid-Gruppe am Protein kommt, sich das Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins um 32 Da vergrößert. Tatsächlich konnte eine Größendifferenz von YnjE um 32 Da nach der Inkubation mit IscS und L-Cystein bestimmt werden. Somit konnte die direkte Persulfurierung des *E. coli* Rhodanese-ähnlichen Proteins YnjE durch die L-Cystein Desulfurase IscS eindeutig bewiesen werden.

In der Massenspektrometrie-Analyse war das Molekulargewicht von YnjE kleiner als die theoretische Berechnung. Zusätzliche ESI-MS-Untersuchungen zeigten, dass am N-Terminus von YnjE eine periplasmatische Erkennungssequenz von 28 Aminosäuren abgespalten wurde (Abb. 3.4). Bislang konnte allerdings nicht bestätigt werden, dass YnjE ausschließlich im Periplasma und nicht im Cytoplasma vorkommt. Es besteht auch die Möglichkeit, dass es zu einer zusätzlichen Abspaltung des C-Terminus kommt, wodurch die katalytische aktive Rhodanese-ähnliche Domäne von YnjE im Cytoplasma verbleibt und am Schwefeltransfer der Moco-Biosynthese involviert sein kann.

1MSGFSMKRVSQMTALAMALGLACSSWAELAKPLTLDQL₄₀.....430

Abb. 3.4 Periplasmatische Signalsequenz von YnjE

Anhand von ESI-MS Analysen konnte beobachtet werden, dass YnjE eine periplasmatische Erkennungssequenz von 28 Aminosäuren besitzt (rot).

3.6.4 Sind IscS und YnjE an der *E. coli* MPT-Synthese beteiligt?

Ob YnjE – zusammen mit IscS – in der Aktivierung der *E. coli* MPT-Synthase beteiligt sind, wurde an der MPT-Synthase durch Inkubation von PrecursorZ und aktivierter MPT-Synthase überprüft. Durch eine Aktivierung der inaktiven MPT-Synthase kommt es zur Konversion von Precursor Z zu MPT. Durch Zugabe von saurem I₂/KI kann das gebildete MPT in das stabile fluoreszierende Oxidationsprodukt Form A umgewandelt und chromatographisch an der HPLC quantifiziert werden. Das Problem dieser Analyse war, dass IscS bereits alleine, mit L-Cystein als Schwefelquelle, in der Lage ist, den Schwefel *in vitro* auf MoaD zu übertragen (57). Sollte jedoch YnjE an der Sulfurierung von MoaD beteiligt sein, so müsste theoretisch die Aktivierung der MPT-Synthase bei geringer IscS-Konzentration durch

die Anwesenheit von YnjE gesteigert werden. Diese Aktivierung müsste zur Folge haben, dass die Menge an gebildetem MPT bzw. Form A erhöht würde, im Vergleich zum Ansatz mit nur IscS und L-Cystein. Tatsächlich konnte, bei gleich bleibender IscS- und steigender YnjE Konzentration, eine Zunahme der gebildeten Form A-Menge beobachtet werden. Das bedeutet, dass die Affinität, die MPT-Synthase zu thiocarboxylieren, von YnjE höher ist im Vergleich zu IscS. Daraus lässt sich schließen, dass diese Reaktion einem „Turn-over“-Mechanismus unterliegt; IscS mobilisiert den Schwefel aus L-Cystein und überträgt ihn auf YnjE. YnjE transportiert den Schwefel auf MoaD und kann erneut durch den IscS-gebundenen Schwefel persulfuriert werden.

3.7 Modell des Schwefelübertragung im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese in *E. coli*

Die Untersuchungen der Schwefelübertragung im zweiten Schritt der Moco-Biosynthese in *E. coli* sind zusammenfassend in Abb. 3.4 in einem Modell dargestellt. Die carboxylierte kleine Untereinheit MoaD dissoziiert von MoaE, bildet mit MoeB einen Adenylatkomplex und wird unter ATP-Verbrauch durch die Adenylierung des C-terminalen Glycins aktiviert (56, 70). Die L-Cystein Desulfurase IscS überträgt den aus L-Cystein mobilisierten Schwefel auf das C-terminale katalytische Cystein des Rhodanese-ähnlichen Proteins YnjE. Das persulfurierte YnjE bindet sowohl an die MoeB-Untereinheit des Adenylatkomplexes, als auch an die große Untereinheit MoaE. YnjE überträgt den gebundenen Schwefel auf MoaD, wodurch dieses am C-terminalen Glycin thiocarboxyliert wird (51). Das thiocarboxylierte MoaD dissoziiert von MoeB und kann sofort an das durch YnjE „immobilisierte“ MoaE binden. Durch die Bindung von MoaD löst sich MoaE von YnjE, und die MPT-Synthase liegt in ihrer aktiven Form vor.

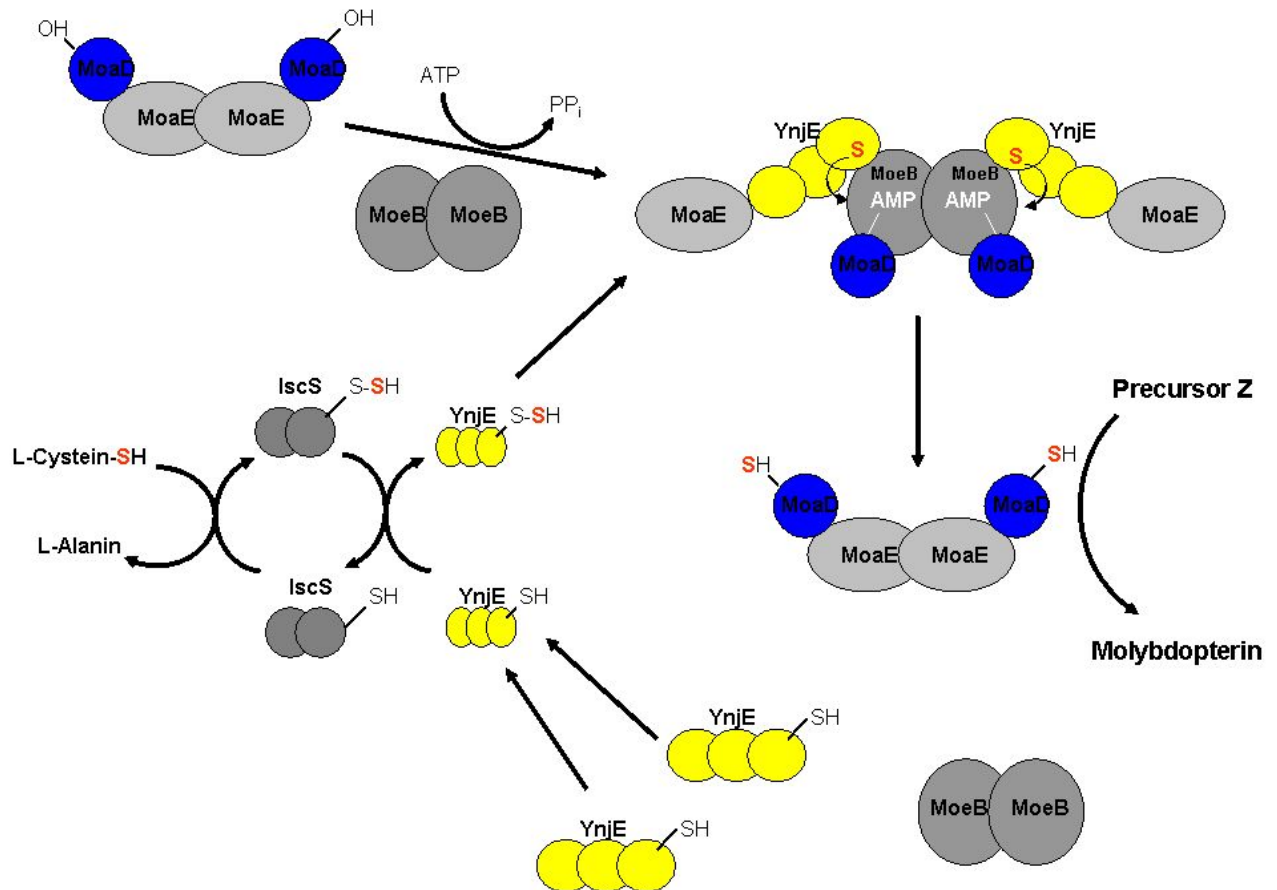


Abb. 3.5 Modell der Schwefelübertragung im zweiten Schritt der *E. coli* Moco-Biosynthese

Der durch die L-Cystein Desulfurase IscS mobilisierte Schwefel wird auf das katalytische C-terminale Cystein des Rhodanese-ähnlichen Proteins YnjE übertragen. Das persulfurierte YnjE bindet an die MoeB Untereinheit des Adenylatkomplexes sowie an die große Untereinheit MoaE. YnjE überträgt den gebundenen Schwefel auf das adenylierte C-terminale Glycin von MoaD. Das thiocarboxylierte MoaD dissoziiert von MoeB und bindet an das durch YnjE immobilisierte MoaE. MoaE löst sich von YnjE und die MPT-Synthase liegt in ihrer aktiven Form vor.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Verwendete Medien, Puffer und Lösungen

Standard-Lösungen, Puffer und Medien wurden nach Sambrook *et al.* (126) mit deionisiertem Wasser hergestellt. Der pH-Wert der Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, mit HCl oder NaOH eingestellt. Medien, Medienstammlösungen und –zusätze wurden durch Autoklavieren (20 min, 1 bar, 121°C) oder Sterilfiltrieren (0,2 µm) sterilisiert.

4.1.2 Verwendete Chemikalien und Enzyme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Invitrogen, BIO-Rad, Duchefa, Fluka, Merck, Riedel de Haen, Roth, Serva und Sigma bezogen. Restriktionsendonucleasen sowie DNA- und Protein-modifizierende Enzyme stammten von den Firmen Sigma, Stratagene, Promega, GIBCO BRL Life Technologies, MBI Fermentas und New England Biolabs.

4.1.3 Bakterien- und Hefe-Stämme

E. coli

Stamm	Referenz	Genotyp	Verwendung
DH5α	Hanahan (1983) (124)	<i>supE 44Δlac U169 (Δ80lacZ ΔM15) hsd R17 recA endA1 gyrA96 thi-1 relA</i>	Klonierung
BL21 (DE3)	Studier & Moffatt (133)	<i>F, ompT, r_B⁻m_B⁻hsdS, gal (λclts857, ind1, San7, nin5, lac UV5-T7 gene 1)</i>	Expression pET und pQE-Vektoren
<i>moaD</i> ⁻ (DE3)	Leimkühler & Rajagopalan 2001 (57)	<i>MJ431 (MJ7 (F⁻ - rpsL) chlM (25) (DE3)</i>	Mutantenkomplementation durch TAP <i>moaD</i> ; Expression der TAP-Konstrukte
<i>moeB</i> ⁻ (DE3)	Leimkühler & Rajagopalan, 2001 (57)	<i>MJ421 (MJ7 (F⁻ - rpsL) chlN (25) (DE3)</i>	Mutantenkomplementation durch TAP <i>moeB</i> ; Expression der TAP-Konstrukte
CL100 (<i>iscS</i> ⁻)	Lauhon <i>et al.</i> 2000 (107)	<i>F araD139Δ(ara leu) 7696 Δ(lac Y74) galU galK hsdR hsdM⁺ ΔiscS strA</i>	Reinigung humaner Sulfitoxidase; Expression der TAP-Konstrukte
MC1061	M.Casadaban, (1980)	<i>F araD139Δ(ara leu) 7696 Δ(lac Y74) galU galK hsdR hsdM⁺ strA</i>	Reinigung humaner Sulfitoxidase
MC1061 (<i>csdA</i> ⁻)	Lauhon	<i>F araD139Δ(ara leu) 7696 Δ(lac Y74) galU galK hsdR hsdM⁺ ΔcsdA strA</i>	Reinigung humaner Sulfitoxidase
CL102 (<i>csdA</i> ⁻)	Lauhon <i>et al.</i>	<i>F araD139Δ(ara leu) 7696 Δ(lac</i>	Reinigung humaner

/csdB ⁻)	2002 (112)	Y74) <i>galU galK hsdR hsdM⁺ ΔcsdA ΔcsdB strA</i>	Sulfitoxidase
CL201(<i>csdB⁻</i>)	Lauhon <i>et al.</i> 2002 (112)	<i>F araD139Δ(ara leu) 7696 Δ(lac Y74) galU galK hsdR hsdM⁺ ΔcsdB strA</i>	Reinigung humaner Sulfitoxidase
TL524	Donahue <i>et al.</i> (2000) (125)	<i>MG1655 Δ(lacZYA-argF)U169zah-735::Tn10,made tetracycline sensitive</i>	Nitratreduktase Aktivitäts-assay
FA036	T.Larson (Virginia Technical University)	<i>TL524ΔsseA::spc^R,ΔygaP::FRT, ΔynjE::FRT, ΔglpE::FRT, ΔpspE::FRT, ΔyceA::FRT, ΔybbB::km^R</i>	Nitratreduktase Aktivitäts-assay
JLD26503	T.Larson (Virginia Technical University)	<i>TL524 ΔsseA::spc^R,ΔygaP::FRT, ΔynjE::FRT, ΔglpE::FRT, ΔpspE::FRT, ΔyceA::FRT, Δthil::km^R</i>	Nitratreduktase Aktivitäts-assay
KC8	Clontech	<i>hsdR; leuB600; trpC9830; pyrF::Tn5, hisB463, lacDX74, strA, galU,K</i>	Tri-Hybrid

S.cerevisiae

Stamm	Referenz	Genotyp	Kultivierung/Verwendung
Hf7c	H.Feilotter, G.Hannon&D.Beach (pers.commun.)	<i>MA Ta,ura3-52, his3-200,lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, LYS2::GAL1-HIS3,URA3::GAL4 17-mers)₃-CYC1-lacZ</i>	Two-Hybrid Screen
AH109	James <i>et al.</i> , (128)	<i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{uas}⁻ GAL1_{TATA}⁻HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}⁻ ADE2,URA3::MEL1_{UAS}⁻ MEL1_{TATA}⁻-lacZ</i>	Tri-Hybrid Screen

4.1.4 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Referenz	Selektion	Verwendung
pBluescript II SK+	Stratagene	amp, Blue-White	Klonierung, Sequenzierung
pGEM-T Easy	Promega	amp, Blue-White	PCR-Klonierung
pTrcHis	Temple <i>et al.</i> (121)	amp	Überexpression in <i>E. coli</i>
pET15	Novagen	amp	Expression N-terminaler His-tag
pGBKT7	Clontech	kana, -Trp	Two-Hybrid, direkte Interaktion
pGADT7	Clontech	amp, -Leu	Two-Hybrid Screen, direkte Interaktion
pBridge	Clontech	amp, -Trp	Tri-Hybrid Screen
pEB327	Gully <i>et al.</i> (122)	amp	TAP-Methode
pACYCDuet-1	Novagen	cm	Co-Expression

Diese Plasmide bilden die Grundlage aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmid-Konstrukte (siehe jeweilige Kapitel und Anhang).

4.2 Molekularbiologische Arbeiten

4.2.1 Klonierungstechniken

Die Arbeit mit rekombinanter DNA auf Plasmidebene umfasst jegliche Neukombination von DNA und dient der Klonierung von PCR-Fragmenten und der Expression von Genen in verschiedenen Organismen.

Der Einsatz aller DNA-modifizierten Enzyme, Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase und alkalische Phosphatase, erfolgte entsprechend den Angaben der Hersteller oder nach Sambrook *et al.* Die Transformation von Plasmid-DNA und Ligationsansätzen in *E. coli* sowie die Herstellung kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen erfolgte ebenfalls nach Sambrook *et al.* Plasmid-DNA Minipräparationen wurden, je nach späterer Verwendung, entweder mit Hilfe der CTAB-Methode nach Del Sal (129) oder durch den NucleoSpin® Plasmid-Kit von Macherey & Nagel durchgeführt. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen erfolgte ebenfalls nach Sambrook *et al.*, DNA aus Agarosegelen wurde den Angaben der Hersteller entsprechend mit dem Easy-Pure™ Kit von Biozym oder dem NucleoSpin® Extract-Kit von Macherey & Nagel aufgereinigt. Die Isolierung von genomischer Gesamt-DNA aus *E. coli* fand anhand des Qiagen Genomic-tip Kit statt.

4.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Standard-PCR-Protokoll nach Sambrook *et al.* wurde den Anforderungen entsprechend abgewandelt. So wurde für die Erstellung von Expressionskonstrukten die *Pwo*-DNA-Polymerase (Peqlab) verwendet, während bei einfachen Nachweis-Reaktionen die *Taq*-Polymerase (Promega; AGS-Gold, Hybaid) Verwendung fand. Sämtliche PCR-Experimente wurden mit Hilfe des Thermocycler Gen Amp PCR-System 2400 von Perkin-Elmer bzw. des PCR-Express Gradient von Hybaid durchgeführt. Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer befindet sich im Anhang.

4.2.3 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde hochreine, über DNA-Isolationskits isolierte Plasmid-DNA (NucleoSpin Plasmid, Macherey & Nagel) eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung von fluoreszenz-markierten ddNTPs des ABI-Prism™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Perkin Elmer) mit einem Pop 6 Polymer auf einem ABI-Prism™ 310 cycle sequencer (PE Applied Biosystems).

4.3 Proteinbiochemische Arbeiten

4.3.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Proteinaufreinigung wurden verschiedene Methoden angewendet. Die Proteine wurden zunächst über Ammoniumsulfatfällung oder Affinitäts-Chromatographie (His-tag) vorgereinigt und anschließend über Gel-Filtration oder Anionenaustauscher-Chromatographie aufgetrennt. Die Aufreinigungen der *E. coli* Rhodanese-ähnlichen Proteine GlpE, YgaPR, PspER und YnjE sind im Detail beschrieben. Die Reinigungen der Proteine MoeB und inaktiver MPT-Synthase erfolgte wie in Ref. 52 und 70 beschrieben.

4.3.2 Expression und Aufreinigung der *E. coli* Rhodanese-ähnlichen Proteine GlpE, YgaPR, PspER und YnjE

Die DNA-Sequenzen der Rhodanesen GlpE, PspER und YgaPR wurden durch spezifische Primer mittels PCR aus genomischer *E. coli* DNA amplifiziert und durch Klonierung über die Restriktionsschnittstellen *Nde*I/*Bam*HI in den pet15b Vektor an einen N-terminalen His-tag fusioniert.

Mit einer 50 ml LB-Amp Übernachtskultur wurde eine 5-Liter Kultur (LB-Amp) angeimpft und die Zellen bei 30 °C wachsen gelassen. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Expression mit 100 µM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) induziert und für weitere 4 h bei 30 °C kultiviert. Durch Zentrifugation (5000 x g, 5 min, 4 °C) sind die Zellen geerntet worden und in 30 ml 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0 resuspendiert und anschließend durch dreimalige Passage durch eine French Pressure Cell Press aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation bei 21000 x g für 30 min bei 4 °C wurde der Überstand zu 8 ml Ni-NTA Matrix (Nickel Nitrilotriacetat) gegeben und für 2 h bei 4 °C geschwenkt. Nach der Inkubation ist das

Gemisch in eine Tropfsäule überführt und mit 3 x 25 ml 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0 und 5 x 25 ml 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0 gewaschen worden. Die Proteinelution erfolgte durch 2,0 ml Schritten mit 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0. Die einzelnen Fraktionen wurden in einem SDS-PAGE überprüft. Die Protein-haltigen gepoolten Fraktionen sind mittels Ultrafiltration (3 kDa, Amicon) auf 1 ml ankonzentriert und auf eine Superose 12 Gelfiltrationssäule, äquilibriert in 50 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, pH 7,5 geladen worden.

4.3.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes eines Rohextrakts erfolgte nach Bradford (119) unter Verwendung von BSA (Rinder-Serum-Albumin Fraktion V) als Standard. Ein Aliquot von 5 µl des Rohextraktes wurde in 800 µl H₂O verdünnt, mit 200 µl Bradford-Reagenz (Biorad; Roth) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert, bevor die Absorption bei 595 nm in einem Spektralphotometer bestimmt wurde. Die Konzentration gereinigter Proteine ist mit Hilfe des kalkulierten molaren Extinktionskoeffizienten und des Molekulargewichts durch eine Absorptionsbestimmung bei 280 nm am Spektralphotometer nach Gill & Hippel (127) ermittelt worden.

4.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinfractionen entsprechend ihres Molekulargewichtes wurden in dieser Arbeit diskontinuierliche Tris/Glycin-SDS-Gelsysteme zwischen 7,5 % und 12,5 % nach Laemmli (120) verwendet. Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden dazu mit 5 x SDS-PAGE-Ladepuffer (50 % Glycerin; 3,5 % SDS; 15 % β-Mercaptoethanol; 0,02 % Bromphenolblau) versetzt und für 5 - 7 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte unter Wasserkühlung bei 150 - 200 V. Im Anschluss sind die aufgetrennten Proteine im Gel mit Coomassie-Lösung angefärbt worden.

4.3.5 Immunoblot-Analyse

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Gele für ca. 10 min in Transferpuffer (10 % MeOH in 1x Tris/Glycin) äquilibriert. Für den Transfer der Proteine in einem diskontinuierlichen semi-dry-Blot auf die Trägermembran (HybondTM-P,

Amersham/Pharmacia; Roti®–PVDF, Roth) wurden 4 Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier luftblasenfrei auf die Apparatur gelegt, bevor die Membran (zuvor mit MeOH benetzt, mit H₂O gewaschen und in Transferpuffer äquilibriert) und weitere 3 Lagen Whatman-Papier aufgebracht wurden. Das Blotting erfolgte für bei 250 mA mit 3 mA/cm². Nach Waschen des Blots in 1x TBS-Lösung (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl) können die transferierten Proteine reversibel mit PonceauS-Lösung (5 % in 1x TBS) angefärbt werden.

Für den immunologischen Nachweis transferierter Proteine wurde die Membran für 1 h bei RT in Blockierungslösung (5 % BSA oder Milchpulver in 1x TBS) inkubiert, bevor der 1:1000 in Blockierungslösung verdünnte primäre Antikörper zugegeben wurde. Nach ca. 2-stündiger Inkubation bei RT unter Schwenken, wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen der Membran für je 5 min in TBSTXS (0,1 % BSA; 0,1 % Triton X-100; 0,05 % SDS; in 1x TBS) und 3 x 5 min 1x TBS entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper Anti-Maus-IgG (Sigma) bzw. Anti-Kaninchen IgG (Sigma) für 1 h bei RT unter Schwenken. Nach erneutem Waschen mit TBSTXS und 0,8% NaCl erfolgte die Färbereaktion der alkalischen Phosphatase durch eine Benetzung der Membran mit ca. 10 ml BCIP/NBT-Reaktionslösung (100 mM Tris-HCl, pH 8,8; 100 mM NaCl; 6,4 mM MgCl₂) nach Zugabe von 66 µl NBT/10 ml (Promega) und 33 µl BCIP/10 ml (Promega). Durch Entfernen der Färbelösung und anschließendem Waschen mit H₂O wurde die Reaktion gestoppt.

In dieser Arbeit sind als primäre Antikörper der monoklonale Anti-His-Tag Antikörper aus Maus (Dianova), der polyklonale Anti-MoeB-Antikörper aus Kaninchen und der polyklonale Anti-MoaD-Antikörper aus Kaninchen für die Detektion rekombinanter Proteine verwendet worden.

4.4 Analytische Methoden

4.4.1 Chemischer Nachweis von Intermediaten der Molybdäncofaktor-Biosynthese (Form A Bestimmung)

Sowohl Molybdopterin (MPT) als auch der Molybdäncofaktor (Moco) selbst sind durch ihr Pteringerüst und die Dithiolen-Gruppe oxidationssensitiv und damit chemisch instabil. Aus diesem Grund findet der Nachweis über ein stabiles Oxidations-Derivat, das durch saure KI/I₂-Oxidation entstehende „Form A-

dephospho“, statt. Form A kann direkt aus Moco oder seiner Vorstufe MPT generiert werden. Die saure Oxidation von MPT mit I_2/KI (1 M HCl) führt zu dem stabilen Produkt Form A, das eine hohe Fluoreszenz aufweist. Da Fluoreszenzmessungen extrem sensitiv sind, können auch geringere Mengen detektiert werden.

Für die *in vitro* Versuche Precursor Z zu MPT zu konvertieren, wurde dieser je nach Ansatz mit inaktiver MPT-Synthase, MoeB, MgATP sowie einer Rhodanese oder Sulfurtransferase 30 min. bei Raumtemperatur in 100 mM Tris/HCl, pH 7.2 in einem Gesamtvolumen von 400 μ l inkubiert und das entstandene MPT als Form A-dephospho detektiert.

Dazu wurden 50 μ l einer wässrig sauren I_2/KI -Lösung (1% I_2 / 2% KI in 1 M HCl) in einem Reaktionsgefäß vorgelegt, mit dem 400 μ l Ansatz aufgefüllt und über Nacht bei RT im Dunkeln inkubiert. Das ausgefallene Protein und andere Niederschläge sind durch 5-minütige Zentrifugation bei 12000 x g pelletiert worden. Der Überstand wurde in ein anderes Reaktionsgefäß überführt, in dem 55 μ l einer frisch angesetzten Ascorbinsäurelösung (1 % in ddH₂O) vorgelegt war. Durch Zugabe von 200 μ l 1 M Tris wurde der pH-Wert der Lösung auf ca. 8,3 eingestellt bevor 16 μ l 1 M MgCl₂ zugesetzt wurden. Anschließend sind 0,5 U einer alkalischen Phosphatase (AP)-Lösung in den Ansatz gegeben worden, was zu einer Abspaltung der terminalen Phosphat-Gruppe führte. Die Inkubation erfolgte für mindestens 30 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln. Um Form A-dephospho in reiner Form zu erhalten, wurde mit dem gewonnenen Extrakt eine isokratische Anionenaustauscher-Chromatographie mit quartärem Aminoethyl (QAE) als Matrixmaterial durchgeführt. Das QAE-Sephadex A 25 Material (fine, Sigma) wurde nach Vorschrift in 1 M NaCl gequollen, in leere Nick-Säulen gefüllt (0,5 ml Matrixvolumen), mit ddH₂O mehrfach gewaschen und mit 1 M Ammoniumacetat in die Acetat-Form überführt. Die Matrix wurde zunächst vor jeder Reinigung mit 1 M Ammoniumacetat 2x bis zur maximalen Säulenhöhe aufgefüllt, um eventuelle Rückstände zu entfernen und sie vollständig in ihre Acetat-Form zu bringen. Danach ist die Säule 3x bis zum oberen Rand mit filtriertem ddH₂O aufgefüllt worden. Nachdem die Probe noch einmal für 5 min. bei 12000 x g zentrifugiert wurde, um Protein-Präzipitate zu entfernen wurde der Ansatz aufgetragen. Nach dem kompletten Einsinken der Probe ist die Säule 3x mit filtriertem ddH₂O gespült worden. Die Elution erfolgte isokratisch mit 10 mM Essigsäure. Zunächst wurde mit 1,4 ml Essigsäure gewaschen (Totvolumen der Säule). Nach vollständigem Einsinken ist das gebundene Form A-dephospho mit 2

ml 10 mM Essigsäure eluiert worden. Zur Untersuchung und Quantifizierung der QAE-gereinigten Form A-dephospho Proben wurden 100 µl auf eine HPLC C18 Reverse Phase Column (4,6 x 250 mm, Hypersil-ODS-Particle, 5 µm) aufgetragen. Form A-dephospho weist ein charakteristisches Fluoreszenzspektrum auf und emittiert bei einer Anregungs-Wellenlänge von 370 nm Strahlung bei 450 nm (25). In dieser Arbeit wurde eine HPLC-Anlage der Agilent Technologies Serie 1100 benutzt. Die Flussrate betrug 1 ml / min. Der Laufpuffer bestand aus 90 % 50 mM NH₄-Acetat und 10 % Methanol. Zur Detektion und Quantifizierung der Proben wurde ein Fluoreszenzdetektor der HPLC 1100 Serie von Agilent genutzt.

4.4.2 Gelfiltration

Die Gel-Filtration kann zur Molekulargewichtsbestimmung eingesetzt werden. Zu diesem Zweck werden Eichgeraden mit Proteinen bekannter Größe erstellt.

Für die Molekulargewichtsanalyse und die *in vitro*-Assemblierungen wurde in dieser Arbeit die Superdex 200 Matrix (Amersham) und für die Proteinaufreinigung die Superose 12 Gel-Filtrationssäule verwendet. Die Gelfiltrationen wurden mit Hilfe einer ÄktaBasic (Amersham) sowie einer FLPC von Pharmacia Biotech bei RT durchgeführt.

4.4.3 Nitratreduktase-Overlay zur qualitativen Bestimmung der *E. coli* Nitratreduktase-Aktivität

Der qualitative Nachweis der Nitratreduktase-Aktivität in einzelnen *E. coli* Kolonien kann mit Hilfe des „Nitratreduktase-Overlay“ Testes erfolgen (131). Das Prinzip beruht auf der Induktion der Nitratreduktase durch anaerobes Wachstum, während der Kultur auf LB-Festmedium. Danach wird die Platte mit KNO₃- und Na-Formiat haltigem Weichagar überschichtet und für 20 min. inkubiert. Über diese Schicht wird nun eine weitere gegossen, die Sulfanilamid und NNEDA enthält, wobei das Produkt der Reduktion von Nitrat zu Nitrit durch Diazotierung von Sulfanilsäure nachgewiesen wird.

Die zu testenden *E. coli* Kulturen wurden für mindestens 2 h auf LB-Platten (evtl. Antibiotika) in einer Anaerob-Kammer wachsen gelassen, bevor sie mit 6 ml einer ca. 50 °C warmen Lösung aus 3 ml 1 M Na-Formiat, 1 % KNO₃ und 3 ml 1,5 % H₂O-Agarose überschichtet wurden. Nach einer Inkubation von 2 h bei 37 °C erfolgte die Farbreaktion durch Überschichten mit 6 ml einer Lösung aus 1,5 ml Sulfanilsäure (4

%), 1,5 ml N-(1-Naphtyl)-ethylen-diamin-hydrochlorid (0,05 %) und 3 ml H₂O-Agarose.

4.4.4 Quantitative Bestimmung der Nitratreduktase-Aktivität

Zur quantitativen Bestimmung der NR-Aktivität wurde der *E.coli* Nitratreduktase Benzylviologen als artifizieller Elektronendonator angeboten (132). Um Benzylviologen in seine reduzierte Form zu überführen wurde Natriumdithionit hinzugegeben. Benzylviologen weist im reduzierten Zustand eine charakteristische Violettfärbung mit einem Absorptionsmaximum bei ~ 600 nm auf. Die Übertragung von 2 Elektronen des Benzylviologens auf die aktive NR ruft eine proportionale Abnahme der Färbung durch die Oxidation des Benzylviologens hervor. Bei der Reaktion werden 2 Mol Benzylviologen pro Mol Nitrat umgesetzt. Zur Auswertung wird die Absorptionsabnahme im Ansatz vermessen. Mittels der Steigung, dem Probenvolumen, dem molaren Extinktionskoeffizienten von Benzylviologen, des Proteingehalts der Probe und der Schichtdicke des Reaktionsgefäßes wird die Aktivität errechnet.

Zur Durchführung wurden zunächst 5 ml Übernachtskulturen der zu testenden *E. coli* Kolonien in LB (evtl. Antibiotika) und 15 mM Na₂NO₃ angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Mit 100 µl dieser Übernacht-Kultur wurden 5 ml LB (evtl. Antibiotika), 1 µl 100 mM IPTG, 75 µl 1 M Na₂NO₃ angeimpft und für 7 – 9 h bei 30 °C geschüttelt. Nach Ernte der Zellen durch zweimaliges Abzentrifugieren (1,5 ml in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß) und anschließendem Resuspendieren (in 1,5 ml Kulturen) wurden durch 1-minütiges Sonifizieren die Zellen aufgeschlossen. Die Proteinkonzentration der Probe wurde im Bradford-Assay bestimmt wobei 100 µl des Lysats in die Reaktionsgefäße (15 ml Glasröhrchen) pipettiert und für eine Stunde in einer Anaerob-Kammer stehen gelassen wurden. Alle folgenden Schritte folgten im anaeroben mit Sauerstoff-freien Lösungen. Zu dem 100 µl Lysat wurde ein Mix aus 1,8 ml H₂O, 40 µl 1 M Tris (pH 6,8), 20 µl KNO₃ und 40 µl 15 mM Benzylviologen zugegeben und die Gefäße zur Messung am Photometer luftdicht mit einem Stopfen verschlossen. Zu dem Ansatz wurden dann 2,5 µl Dithionit-Lösung (Spatelspitze Dithionit in 10 ml anaeroben H₂O, in Anaerob-Kammer angesetzt), durch den Verschluss pipettiert, kurz geschwenkt und die Reaktion bei 600 nm für 60 s im Photometer verfolgt.

4.4.5 Cytochrom c-Assay zur Bestimmung der Sulfitoxidase-Aktivität

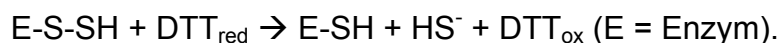
Die Cytochrom c-Reduktase Aktivität der in den *E. coli* Sulfurtransferase-Mutantenstämmen heterolog exprimierten humanen Sulfitoxidase wurde mit einer Endkonzentration von 50 µmol Cytochrom c und einer Natriumsulfit-Konzentration von 400 µmol in einem Gesamtvolumen von 1 ml (20 mM Tris/Acetat, pH 8.0, 1 mM EDTA) durch Messung der Absorptionssteigerung bei 550 nm über 1 min verfolgt. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde der Cytochrom c-Umsatz (Extinktionskoeffizient ε von 19630 M⁻¹ cm⁻¹ bei 550 nm) mit der eingesetzten Enzymmenge bestimmt.

4.4.6 Sörbos-Assay zur Detektion der Sulfurtransferase-Aktivität

Die Sulfurtransferase-Aktivität wurde nach der Methode von Westley (130) bestimmt. Die Reaktionen enthielten, neben dem jeweiligen Protein 50 mM Natrium-Thiosulfat und 50 mM Kaliumcyanid in einem Gesamtvolumen von 500 µl in 100 mM Tris/Acetat, pH 8,6. Nach einer Inkubation von 5 – 60 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 µl Formaldehyd (15 %) abgestoppt und das entstandene Thiocyanat durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Hierfür wurden 750 µl Sörbo-Reagenz (100g Fe(NO₃)₃ x 9 H₂O und 200 ml 65 % HNO₃ pro 1500 ml) zu den Ansätzen gegeben, und das komplexierte Thiocyanat (Rhodanid) bei 460 nm im Spektralphotometer durch seinen Extinktionskoeffizienten von 4200 M⁻¹ x cm⁻¹ bzw. eine Thiocyanat-Eichgerade quantifiziert.

4.4.7 DTT Assay

Im DTT-Assay nach Pecci *et al.* (136) fungiert DTT als Schwefelakzeptor. Wird reduzierte DTT durch eine Sulfurtransferase persulfuriert, zerfällt es zu H₂S und oxidiertem DTT nach folgender chemischer Reaktionsgleichung:



Das oxidierte DTT kann photometrisch bei 285 nm nachgewiesen werden.

2-3 µM Enzym wurden in ein Volumen von 700 µl (50 mM Tris/HCL, pH 8.0) gegeben und die exakte Enzymkonzentration bei 280 nm bestimmt. Anschließend sind 10 mM Thiosulfat dazugegeben worden und die Reaktion mit 20 mM DTT gestartet. Die Enzymreaktion wurde bei 285 nm (konstant 37 °C) über 1 min verfolgt. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde das oxidierte DTT (Extinktionskoeffizient ε von 275 M⁻¹ cm⁻¹ bei 285 nm) mit der eingesetzten Enzymmenge bestimmt.

4.5 Die „Tandem Affinity Purification“ (TAP) Methode

Die Tandem Affinity Purification (TAP) Methode ermöglicht es, Protein-Komplexe unter nativen Bedingungen schnell und schonend zu reinigen.

Die Methode wurde ursprünglich von Séraphin *et al.* (123) für *Saccharomyces cerevisiae* entwickelt und von Gully *et al.* (122) für *E. coli* etabliert.

Die Methode basiert auf der Fusion eines Köderproteins mit einem C- oder N-terminalen TAP-Tag. Der TAP-Tag besteht aus einer IgG-bindenden Domäne des *Staphylococcus aureus* Protein A (Prot A) und einer Calmodulin bindenden Domäne (CB). Beide Domänen sind durch eine TEV Protease cleavage site getrennt. Der N-terminale TAP-Tag besitzt eine zusätzliche Enterokinase (EK) cleavage site.

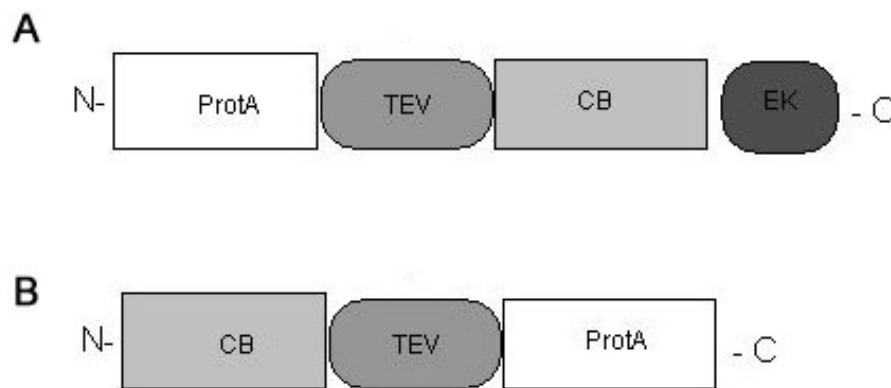


Abb. 4.1 Der TAP-Tag

(A) N-terminaler TAP-Tag; (B) C-terminaler TAP-Tag. Der TAP-Tag besteht aus einer IgG bindenden Protein A Domäne (Prot A), einer TEV Protease cleavage site (TEV) und einer Calmodulin bindenden Domäne (CB). Der N-terminale TAP-Tag besitzt eine zusätzliche Enterokinase cleavage site (EK).

Das Reinigungsprinzip der TAP-Methode beruht auf zwei Affinitätsschritten:

Zuerst bindet die Protein A-Domäne des Köderproteins an eine IgG-Matrix. Anschließende Waschschrte gewährleisten, dass nur spezifische Protein-Protein-Interaktionen bestehen bleiben. Durch die Inkubation mit einer TEV Protease wird die Protein A-Domäne abgespalten und das Protein von der Matrix eluiert. Im zweiten Affinitätsschritt erfolgt die Bindung an eine Calmodulin-Matrix. Protein-Komplexe können durch EGTA eluiert werden.

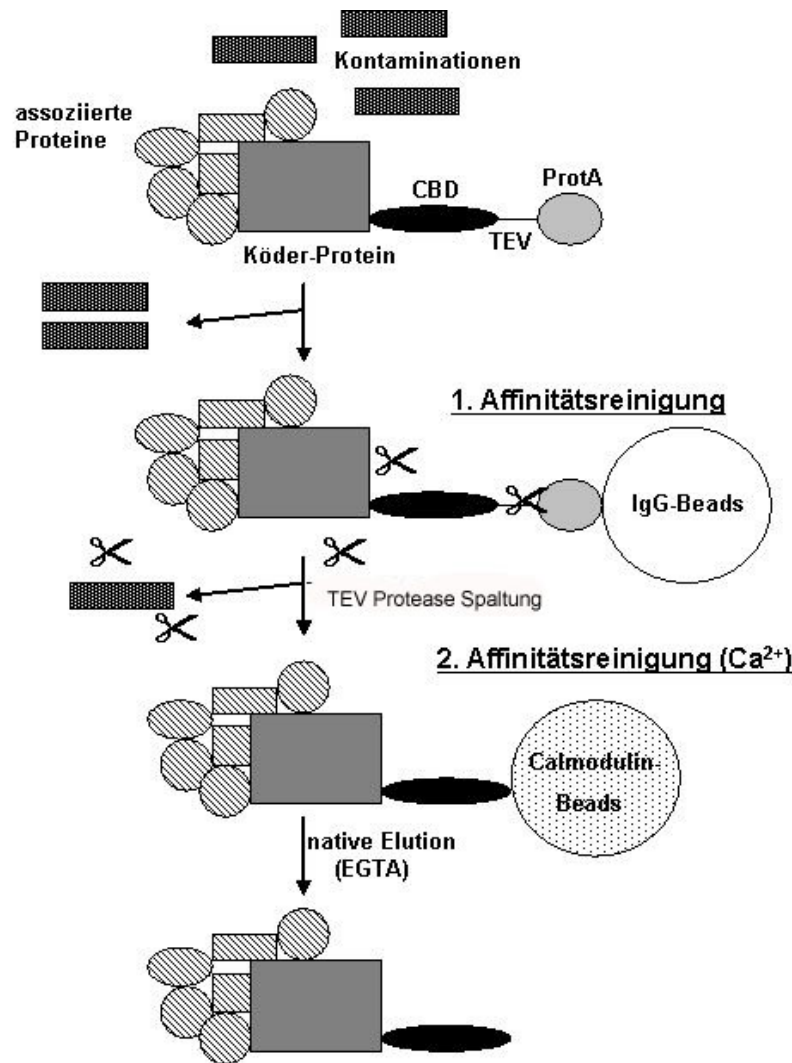


Abb. 4.2 Überblick der TAP-Methode nach Séraphin et al. (123)

Die Aufreinigung der mit dem Köderprotein interagierenden Proteine erfolgt durch zwei Affinitätsreinigungsschritte. Im ersten Schritt bindet die Protein A Domäne (ProtA) des TAP-Tags an eine IgG-Matrix. Anschließend wird die Protein A Domäne durch Inkubation mit einer TEV Protease abgespalten und die Calmodulin bindende Domäne (CBD) freigelegt. Diese bindet an eine Calmodulin Matrix und der gereinigte Protein-Komplex kann anschließend durch Zugabe von EGTA eluiert werden.

Die Elutionsfraktionen wurden anschließend anhand SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Die sichtbaren Proteinbanden wurden aus dem Gel geschnitten, gewaschen, tryptisch verdaut und anhand Massenspektroskopie (MS) identifiziert. Die DNA-Sequenzen von *moeB* und *moaD* wurden über die Restriktionsstellen *SaI* und *HindIII* in das zur Verfügung stehende Plasmid pEB327 kloniert. Bei pEB327 handelte es sich um einen pBAD24 Vektor mit einem N-terminalen TAP-Tag (122). In diesem Plasmid wird die Gentranskription durch den P_{BAD} Promotor des *araBAD*

Operon reguliert und die rekombinante Proteinexpression durch Arabinose induziert. Zur Proteinexpression wurden die hergestellten Konstrukte in die *E. coli* Mutantenstämme *moeB*⁻(DE3) (10,11), *moaD*⁻(DE3) (12) und CL100(*iscS*⁻) (DE3) (107) transformiert.

Mit einer 10 ml-Übernachtskultur wurde eine 2-Liter Expressionskultur angeimpft und bei 30 °C wachsen gelassen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde die Kultur mit 0,01 % Arabinose induziert und für 4 h exprimiert (bei der pACYCDuet-1*ynjE* Co-Expression wurde das Plasmid parallel mit 0,1 % IPTG induziert). Anschließend sind die Zellen geerntet, mit H₂O gewaschen und in 20 ml IPP50-Prot.A Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 0,1 % NP40) resuspendiert worden. Nach dreimaliger Passage durch eine French Press wurden die Zellen bei 20000 x g, 4 °C, für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10 ml einer in IPP50-Prot.A Puffer-äquilibrierten IgG-Sepharose Matrix (Pharmacia) für 2 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Das Gemisch ist in eine Tropfsäule überführt und mit 5 x 10 ml IPP50-Prot.A Puffer gewaschen worden. Die gewaschenen Beads wurden mit 10 ml TEV-Puffer (GIBCO BRL) mit 100 U rTEV-Protease (GIBCO BRL) für 2 h bei 16 °C inkubiert. Der Überstand wurde auf 10 ml in IPP50-Calmodulin-binding-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 0,1 % NP40, 1 mM Mg-Acetat, 2 mM CaCl₂) äquilibrierte Calmodulin-Matrix (Stratagene) gegeben und für 1 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Die Beads wurden anschließend mit 5 x 10 ml IPP50-Calmodulin-binding-Puffer gewaschen und die Proteinkomplexe durch IPP50-Calmodulin-Elutions-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 0,1 % NP40, 1 mM Mg-Acetat, 2 mM EGTA) in 1 ml Fraktionen eluiert. Die Elutionsfraktionen sind anschließend gepoolt, mit Centricon-Konzentratoren (3 kDa, Amicon) auf 300 µl ankonzentriert und auf ein 15 %iges SDS-PAGE aufgetragen worden. Die Coomassie-gefärbten Proteinbanden sind sauber aus dem Gel eluiert, mit ddH₂O gespült und anhand Massenspektrometrie identifiziert worden.

4.6 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die massenspektrometrischen Analysen in dieser Arbeit wurden an der GBF-Braunschweig durch Dr. Manfred Nimtz durchgeführt.

Die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie umfaßt folgende Teilschritte:

Eine Proteinprobe in einem sauren flüchtigen Lösungsmittel wird in ein Massenspektrometer gesprüht. Das Lösungsmittel in den einzelnen Tröpfchen

verdampft rasch in der Vakuumkammer des Gerätes, wobei nichtfragmentierte bloße Proteinmoleküle zurückbleiben, die vielfache positive Ladungen tragen. Diese geladenen Proteinmoleküle werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und dann in einem magnetischen Feld abgelenkt. Die Trennung erfolgt nach dem Verhältnis ihrer Masse zu ihrer Ladung. Das Massenspektrum eines reinen Proteins besteht aus einer Anzahl von Peaks, die unterschiedlichen Anzahlen gebundener Protonen entsprechen.

Der Aufbau einer MS lässt sich somit in vier Hauptkomponenten aufgliedern: Probenaufgabesystem, Ionisierung, Massentrennung und Detektion.

Die Desolvatisierung der Ionen erfolgt durch kontinuierliche Zuführung des gelösten Analyten an die Spitze einer leitfähigen Kapillare. Das angelegte elektrische Feld zwischen Kapillarspitze und Massenspektrometer durchdringt die Analytlösung und trennt die Ionen ähnlich wie bei der Elektrophorese. Bei ausreichend hohem elektrischen Feld ist der Flüssigkeitskonus stabil und emittiert von seiner Spitze einen kontinuierlichen, filamentartigen Flüssigkeitsstrom, dieser wird mit Entfernung zur Anode instabil und zerfällt, wobei die Oberfläche der entstehenden Tröpfchen je nach Polarisierung mit positiven oder negativen Ladungen angereichert ist, es tritt ein kontinuierlicher Lösungsmittelverlust durch Verdampfen auf, wodurch die Ladungsdichte der Oberfläche zunimmt. Es kommt zu einem spontanen Zerfall der Tröpfchen durch Coulomb-Explosionen und schließlich zur Desolvatisierung der Analytmoleküle beim Transfer in das Massenspektrometer.

Für die Messungen wurden 1-3 µl Aliquots der Protein-Lösungen (in 5 mM NH_4Ac -Puffer, pH 8,0) 1:1 mit Methanol verdünnt und auf eine Konzentration von 1-10 pmol/µl mit 10 % Ameisensäure verdünnt. Die Proben wurden in eine goldbeschichtete Nanospray-Glaskapillare, welche vor dem Eingangsloch eines QTOF-II Instrumentes (Micromass, UK) platziert wurde, gegeben. Ca. 1000 V wurden angelegt und die Ionen im „Time-of-Flight“-Analysator getrennt. Für die MS/MS Experimente wurden die Eltern-Ionen vom Quadrupol-Massenfilter ausgewählt und der Dissoziation durch Kollision zugeführt. Die Trennung der Tochter-Ionen erfolgte wiederum im „Time-of-Flight“-Analysator. Die resultierenden Spektren wurden mit der MaxEnt1 Software (Micromass, UK) dargestellt und mit dem MaxEnt3 Programm bearbeitet. Die Peptidsequenzen wurden mit der PepSeq Software bestimmt. Der tryptische Verdau der Protein-Lösungen für die MS/MS Analysen erfolgte durch 1:1 Inkubation mit einer Trypsin-Lösung (Promega, 2 µg/ml in 50 mM NH_4HCO_3) über

Nacht bei 37 °C. Die Peptide wurden mit C-18 ZipTip-Pipetten (Millipore) entsalzt und nach dem Waschen mit 0,1 % Ameisensäure mit 10 µl 0,5 % Ameisensäure (in 65 % Methanol) eluiert.

4.7 Circularer Dichroismus (CD) Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie dient in erster Linie der Konfigurations- und Konformationsanalyse chiraler Moleküle. In optisch aktiven Strukturen ist die Lichtgeschwindigkeit für links- bzw. rechtsgerichtet zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich groß. Fällt daher zirkular polarisiertes Licht auf eine Probe mit einer optisch aktiven Substanz, so tritt nach dem Durchlaufen der Probe eine Polarisationskomponente gegenüber der anderen verzögert auf, d.h. die optisch aktive Substanz hat unterschiedliche Brechungsindices für links- bzw. rechtspolarisiertes Licht. Da sich linear polarisiertes Licht aus zwei überlagerten, rechts und links gerichtet zirkular polarisierten Komponenten zusammensetzt, führt die Verzögerung einer Komponente wiederum zu einer Drehung der Polarisationsebene bei linear polarisiertem Licht.

Die wohl wichtigste Anwendung der CD-Spektroskopie ist die Analyse von Proteinsekundärstrukturen. Da Proteine dissymmetrisch sind – also nicht mit ihrem Spiegelbild zur Deckung gebracht werden können – zeigen sie optische Aktivität. Aufgrund ihrer L-Konfiguration am α -Kohlenstoffatom sind die in Proteinen gebundenen Aminosäuren (bis auf Glycin) intrinsisch optisch aktiv. Elektronische Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Resten eines Proteins tragen ebenfalls zur optischen Aktivität bei.

CD-Spektren im fernen UV-Bereich sind empfindlich für die Konformation der Proteinhauptkette. Informativ sind dabei die Wellenlängen von etwa 160 bis 250 nm, wo sich die Absorptionsbanden der peptidischen Amidgruppe vielfach überlappen.

In dieser Arbeit wurden je 0,2 mg/ml Protein in einem Volumen von 220 µl (40 mM KPO₄, pH 7,2) an einem Jasco J-810 CD-Spektrometer in dem Wellenlängenbereich von 180-260 nm gemessen und anschließend ausgewertet. Dabei sind folgende Parameter eingestellt worden: Data Pitch: 0,2 nm; Scan speed: 200 nm/min; Response: 1 s; Accumulation: 6; far UV: 180-260 nm; N₂-Fluß: 5.

4.8 Fluoreszenz-Quenching

Ein photometrisch angeregtes Molekül kann auf unterschiedliche Weise wieder in den energetischen Grundzustand gelangen: neben der Möglichkeit zur strahlungslosen Relaxation, bei der die Energiedifferenz in Form von Schwingungsenergie, letztlich als Wärme, abgegeben wird, kann ein Photon, anhand von Fluoreszenz, emittiert werden. In analytischen Fluoreszenzuntersuchungen an Biomolekülen unterscheidet man, ob die Fluoreszenz von direkt am Molekül vorhandenen Gruppen benutzt werden kann, oder ob zusätzliche Moleküle als Fluorophore erst in das Molekül eingebaut werden müssen. Im ersten Fall bezeichnet man den Prozess als intrinsische Fluoreszenz, im zweiten Fall als extrinsische Fluoreszenz. Bei Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie auf Proteine ohne weitere Farbstoffe oder fluoreszierende Cofaktoren kann im Wesentlichen nur die Fluoreszenz der Aminosäure Tryptophan verwendet werden. Aromatische Aminosäuren zeigen Absorptionsbanden der Seitenketten bei ca. 280 nm (Tryptophan), so dass die Fluoreszenz dieses elektronischen Übergangs bei Wellenlängen von oberhalb 300 bis 350 nm beobachtet werden kann. Fluoreszenz-Löschung (Quenching) tritt auf, wenn die Energie von einem angeregten Molekül auf ein zweites Molekül übertragen wird, so dass die Wahrscheinlichkeit der Emission sinkt und der angeregte Zustand strahlungslos deaktiviert wird.

Die intrinsische Fluoreszenz von Proteinen kann auch verändert werden, wenn es z.B. zu einer stabilen Persulfidbindung kommt. Diese Veränderung beruht auf dem Energietransfer zwischen der Persulfidbindung und den Tryptophanresten im Protein (22,23). In dieser Arbeit wurden die unterschiedlichen Emissionen von unbeladenen und schwefelbeladenen Rhodanesen (10 μ M) gemessen und analysiert. Bei einer Anregungswellenlänge von 280 bzw. 295 nm wurde ein Emissionsspektrum von 300-400 nm an einem Perkin-Elmer LS-50 Fluoreszenzspektrometer aufgenommen.

4.9 Immunpräzipitation

Eine Vermischung von löslichem Antigen mit spezifischen Antikörpern führt zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit Verlust der Löslichkeit der Antigen-Antikörper-Komplexe. Dieser Vorgang wird traditionell Immunpräzipitation genannt. In dieser Arbeit sind 10 μ l polyklonaler MoeB- bzw. MoaD-Antikörper (aus Kaninchen) an 50 μ l Protein G SepharoseTM Beads (Amersham) in einem Volumen von 100 μ l (100 mM Tris, pH 7,2) für 3 h bei RT gekoppelt worden. Nach dem Koppeln sind die Beads 5-

10 x mit 500 µl Puffer gewaschen worden. Die Inkubation der gekoppelten Beads mit je 5 µM Protein fand bei 4 °C über Nacht unter langsamen Schwenken statt. Der Proteinmix ist anschließend komplett abgesaugt (mit einer 26G-Kanüle, Braun) und die Beads mindestens 5 x mit 500 µl Puffer gewaschen worden. Die trockenen Beads werden in 50 µl Probenpuffer (ohne DTT oder + β-Mercaptoethanol) aufgenommen und für 10 min bei 70 °C erhitzt. Die Beads wurden für 5 min bei 14000 rpm pelletiert, der Überstand auf ein 15 %iges SDS-PAGE aufgetragen und anschließend Coomassie gefärbt.

4.10 Das Hefe Two- und Tri-Hybrid System

Anhand des Hefe Two- und Tri-Hybrid Systems können Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* detektiert werden. Es kann sich dabei um bekannte Proteinpartner handeln oder um die Identifizierung neuer Protein-Interaktionen aus einer cDNA Bank (Library). Das System beruht auf der Tatsache, dass viele eukaryotische Transkriptionsaktivatoren aus zwei physikalisch trennbaren modulartigen Domänen bestehen, der DNA-Bindungsdomäne (BD) und der Aktivierungsdomäne (AD). Das in dieser Arbeit verwendete MATCHMAKER 3 „Two-Hybrid“-System (Clontech, Heidelberg) basiert auf dem Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4, dessen DNA-Bindungsdomäne unter Kontrolle der Promotor-Sequenz UAS („upstream activating sequence“) von Gal1 steht, an die für den Nachweis einer Interaktion bzw. zur Selektionierung erforderliche Reportergene *lacZ*, *HIS3*, *MEL1* und *ADE2* gekoppelt sind. In der Praxis wird das Köderprotein an eine GAL4-DNA bindende Domäne und die Ziel- oder Library-Proteine an eine GAL4-aktivierende Domäne fusioniert. Kommt es zur Interaktion in der Hefezelle, wird der Transkriptionsfaktor GAL4 funktionell wiederhergestellt und die Expression der *lacZ*-Reportergene wird initiiert. Das *lacZ*-Gen vermittelt eine β-Galactosidase-Aktivität, das *HIS3*-Gen erlaubt das Wachstum auf Histidin-freiem Medium, *ADE2* ermöglicht Wachstum auf Adenin-freiem Medium und *MEL1* vermittelt eine α-Galaktosidase-Aktivität.

Das Prinzip des Tri-Hybrid System basiert auf dem pBridgeTM Vektor, der durch seine zwei „multiple cloning sites“ die gleichzeitige Expression eines Köder- und eines Brückenproteins gewährleistet. Dabei wird ein Protein an eine GAL4-DNA-bindende Domäne fusioniert. Das andere sogenannte „Brückenprotein“ wird an eine Kern-Lokalisierungs Sequenz fusioniert, die einen essentiellen Teil der GAL4-DNA-bindende Domäne ausmacht. Das Brückenprotein unterliegt einem *MET25* Promotor

wodurch die Expression durch den Methioningehalt im Medium induziert werden kann. Nur durch die Interaktion von Köder- und Brückenprotein, sowie dem Protein mit fusionierter GAL4-aktivierender Domäne (z.B. cDNA-Bank) kommt es zur Initiierung der Reportergenexpression.

4.10.1 Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* Zellen

Für die Herstellung kompetenter Hefezellen werden Übernacht-Vorkulturen in YPD-Medium (eventuell Selektionsantibiotikum oder SD-Selektionsmedium) bei 30 °C und 240 rpm angeschüttelt. Aus dieser Vorkultur wurde eine 300 ml-Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0,2 - 0,4 angeimpft und für weitere 3 Stunden bei 30 °C und 240 rpm inkubiert. (Nach dieser Zeit sollte die OD₆₀₀ bei mindestens 0,5 liegen). Die Zellen sind bei 1000 x g, 5 min und RT pelletiert und vorsichtig in 25 ml sterilem H₂O resuspendiert worden. Die Zellen wurden erneut wie oben pelletiert und das Pellet in frisch angesetzter, sterilen TE/LiAc-Lösung (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat, pH 7,5) resuspendiert. Die Kompetenz der Zellen bleibt für ca. 3 h bei RT erhalten.

4.10.2 Transformation von *S. cerevisiae* mittels LiAc/PEG-Methode

Für die Transformation der Hefe wurden 100 ng Plasmid-DNA und 100 µg ssLachs-Sperma-DNA in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße vorgelegt. Pro Ansatz wurden 100 µl kompetente Hefezellen und 600 µl frisch angesetzte PEG/LiAc-Lösung (Endkonzentration: 40 % PEG, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7,5) zugesetzt. Nach 30minütiger Inkubation bei 30 °C und 200 rpm wurden 70 µl DMSO zugesetzt. Es folgt eine Hitzeschock-Behandlung bei 42 °C für 15 min, gefolgt von einer Abkühlung auf Eis. Die Zellen wurden in einer Mikrofuge bei 14000 x g für 10 s pelletiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 250 µl sterilem 10 mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 7,5 resuspendiert. Zur Selektion der transformierten Hefeklonen, wurde der Transformationsansatz auf YPD-Antibiotikum-Agarplatten oder SD-Selektions-Agarplatten ausplattiert und für 3 - 5 Tage bei 30 °C inkubiert.

4.10.3 „Library Scale“ Co-Transformation

Bei der Library Scale Co-Transformation wurden der Vektor mit dem Zielprotein und die cDNA Bank parallel in den Hefestamm transformiert. Mehrere Hefekolonien wurden in 1 ml YPD-Medium unter vortexen gelöst. Mit dieser 1 ml Zellkultur wurden

30 ml YPD-Medium angeimpft und für 16 - 18 h bei 30 °C und 250 rpm inkubiert, bis die stationäre Phase erreicht war ($OD_{600} > 1,5$). Mit dieser ÜN-Vorkultur sind anschließend 300 ml YPD-Medium auf eine OD_{600} von 0,2 - 0,3 eingestellt und für weitere 3 h bei 30 °C und 250 rpm geschüttelt worden. Nach diesen 3 h sollte die OD_{600} bei $0,5 \pm 0,1$ liegen. Die Zellen wurden bei $1000 \times g$ und RT für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 50 ml sterilen H_2O resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen pelletiert. Das Pellet wurde in 800 µl frisch präparierter, steriler TE/LiAc-Lösung (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7,5) resuspendiert und die PEG/LiAc-Lösung (Endkonzentration: 40 % PEG, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 100 mM LiAc, pH 7,5) vorbereitet. Es wurden folgende Komponenten gemischt: 50 µg cDNA-Bankvektor, 2 mg ssHeringsperma-DNA und 800 µl kompetente Zellen. Der ganze Ansatz wurde gründlich gevortext, bevor 6 ml sterile PEG/LiAc-Lösung hinzugegeben, erneut gevortext und bei 30 °C für 30 min mit 200 rpm inkubiert wurde. Nach Zugabe von 7 ml DMSO wurde der Ansatz unter vorsichtigem Schwenken in einem Wasserbad bei 42 °C für 15 min einem Hitzeschock unterzogen. Die Zellen wurden für 1 - 2 min auf Eis abgekühlt und bei RT mit $1000 \times g$ 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml YPD resuspendiert und auf SD-Selektionsplatten ausplattiert.

4.10.4 Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae*

3 ml YPD (oder entsprechendes Selektionsmedium) wurden angeimpft und die Kultur für 1 - 3 Tage bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen aus 1,5 ml Suspension wurden für 5 s in einer Tischzentrifuge pelletiert, und die Zellen nach dem Dekantieren des Überstandes in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lysispuffer, 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und ca. 0,3 g Säure-gewaschene Glasperlen (Sigma), wurde der Ansatz für 2 min gevortext und anschließend für 5 min bei 14000 rpm und RT zentrifugiert. Die wässrige Phase ist mit 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat und 2,5 Vol. 96 % Ethanol (-20 °C) versetzt worden und die DNA für 30 min bei -20 °C präzipitiert. Durch Zentrifugation für 5 min bei 14000 rpm und 4 °C wurde die DNA pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut auf gleiche Weise zentrifugiert, anschließend getrocknet und für die Elektroporation in 20 µl H_2O aufgenommen. Für die Elektroporation wurden 2 µl DNA eingesetzt.

4.10.5 Klonierung der pBridge™ Konstrukte für das Tri-Hybrid System

Die Nukleotidsequenzen von *moeB* und *moaD* wurden über die Restriktionsschnittstellen *NotI/BglII* in die „multiple-cloning site II“ (MCS II) und im umgekehrten Fall über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI/BamHI* in die „multiple-cloning site I“ (MCS I) kloniert. Das pBridge-Konstrukt wurde in kompetente AH109 Hefezellen transformiert und gegen eine *E. coli* DNA Bank (im pGADT10 Vektor) gescreent. Es wurde auf höchster Stringenz (SD -Leu, -Trp, -His, -Ade, -Met) auf Interaktion selektiert. Im β -Galaktosidase-Assay wurde anschließend auf falsch-positive-Klone getestet. Damit die „positive“ Hefezelle das pBridge Konstrukt verliert, wurde auf Leucinauxotrophie selektiert, da beide Vektoren (pBridge und pGAD10) eine Ampicilinkassette besitzen. Das DNA-Plasmid ist anschließend aus der Hefe isoliert und in kompetente *E. coli* KC8 Zellen transformiert worden, bevor es erneut isoliert und ansequenziert wurde.

4.10.6 Klonierung der Two-Hybrid Konstrukte für die *in vivo* Analyse direkter Protein-Interaktionen

Um die direkte *in vivo* Interaktion von zwei bekannten Proteinen zu untersuchen, wurde die jeweiligen Nukleotidsequenzen in die Two-Hybrid Vektoren pGADT7 (GAL4-aktivierende Domäne) und pGBKT7 (GAL4-DNA bindende Domäne) kloniert und in den *Saccharomyces cerevisiae* Stamm HF7c co-transformiert.

Dazu wurden die Nukleotidsequenzen der *E. coli* Rhodanese-ähnlichen Proteine *ynjE*, *glpE*, *pspE*, *ygaP*, *sseA*, *yceA* und *thi* und der *E. coli* Sulfurtransferasen *csdA*, *csdB* und *iscS*, sowie *moeB* und *moaE* über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI/BamHI* bzw. *NdeI/BamHI* in die Vektoren pGADT7 und pGBKT7 kloniert und in den *S. cerevisiae* Hefestamm HF7c co-transformiert.

Die Transformationsansätze wurden auf SD-Mangelmedium ohne Leucin, Tryptophan und Histidin ausplattiert. Somit konnte die erfolgreiche Transformation beider Vektoren (-Leu, -Trp) festgestellt und gleichzeitig auf mögliche Interaktionen durch Anschalten der Reportergene (-His) getestet werden.

Die Aktivität der gewachsenen Klone wurde anschließend über das gebildete Enzym β -Galaktosidase nachgewiesen.

4.10.7 β -Galaktosidase-Filter-Assay

Die auf den Selektionsplatten gewachsenen Hefekolonien wurden auf Nitrocellulose Membranfilter (Pall Gelman Sciences, Rossdorf) übertragen. Durch kurzes Einfrieren des Filters in flüssigem Stickstoff werden die Hefezellwände aufgeschlossen.

Anschließend ist der Filter auf ein mit frisch angesetzttem Reaktionspuffer (50 ml Z-Puffer (16,1 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 5,5 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,75 g/l KCl, 0,246 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, pH 7,0), 135 μl β -Mercaptoethanol, 835 μl X- β -Gal (2% in DMSO) getränktes Filterpapier aufgebracht worden und für bis zu 8 h bei 30 °C inkubiert. Während dieser Zeit wurde regelmäßig auf Blaufärbung kontrolliert. Eine Blaufärbung innerhalb der 8 Stunden zeigt eine Interaktion der beiden Proteine an.

4.10.8 β -Galaktosidase-Liquid-Assay

Zur quantitativen Analyse der β -Galaktosidase-Aktivität wurde der β -Galaktosidase Liquid Assay angewendet. Aktive β -Galaktosidase hydrolysiert das Substrat ONPG (2-Nitrophenyl-beta-D-galactopyranosid) in D-Galaktose und 2-o-Nitrophenol. Letzteres kann durch einen gelben Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 420 nm photometrisch vermessen werden. Eine 8 ml YPD-Vorkultur wird mit 2 ml einer Übernachtskultur (SD –Leu –Trp) angeimpft, gevortext und 3 – 5 h bei 30 °C und 240 rpm wachsen gelassen. Ist eine OD_{600} von 0,5 – 0,8 erreicht, wird die jeweils exakte OD_{600} von 1 ml Kultur bestimmt und notiert. 7,5 ml des Ansatzes wurden in neue sterile Röhrchen überführt, pelletiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 5 ml sterilem Z-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Nach wiederholtem Pelletieren wurde das Hefepellet in 500 μl Z-Puffer aufgenommen, in sterile Eppendorfgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff bei -70 °C gefroren. Zum Aufbrechen der Zellwand wurden die Proben 3x bei 37 °C aufgetaut und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. 100 μl aufgeschlossener Hefesuspension wurden mit 700 μl Z-Puffer + β -Mercaptoethanol versetzt und die Enzymreaktion mit 160 μl ONPG-Lösung gestartet. Die Ansätze wurden gevortext und bei 30 °C inkubiert wobei die Zeit exakt gemessen wurde. (Es wurden jeweils 3 Parallelansätze gemessen. Der Nullwert enthielt statt Hefesuspension 100 μl Z-Puffer). Kam es zu einer Gelbfärbung eines Ansatzes wurde dieser mit 500 μl 1 M Na_2CO_3 abgestoppt und die Inkubationszeit notiert. Der abgestoppte Ansatz wurde für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand bei 420 nm photometrisch gemessen. Zur Auswertung der β -Galaktosidase Aktivität wurde die OD_{420} in β -Galaktosidase Units

umgerechnet. Ein β -Galaktosidase Unit definiert die Enzymmenge die 1 μ mol ONPG in einer Minute pro Zelle in 2-o-Nitrophenol und D-Galactose hydrolysiert (Miller, 1972; Miller 1992).

$$\beta\text{-Galaktosidase Units} = 1000 \times \text{OD}_{420} / (t \times V \times \text{OD}_{600})$$

t = Inkubationszeit

V = 0,1 x Konzentrationsfaktor

OD₆₀₀ = A₆₀₀ von 1 ml Hefekultur

4.10.9 Herstellung elektro-kompetenter *E. coli* Zellen

Bei der Transformation durch Elektroporation wurden anhand hoher Spannung kurzfristig Poren in der Zellmembran erzeugt, wodurch die DNA in die Zelle eindringen konnte. Die Herstellung kompetenter Zellen beruhte daher auf der Entfernung der dabei störenden Salze. Dieses wurde durch Waschen mit dest. H₂O erreicht. Für die Transformation durch Elektroporation sollten die kompetenten Zellen immer frisch hergestellt werden. Die Aliquots konnten aber auch durch Zugabe von 10 %-igem Glycerol und anschließendem Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei –70 °C gelagert werden.

100 ml LB (oder SOC) wurden mit 1 ml ÜN-Kultur angeimpft (OD₆₀₀ von ca. 0,1 einstellen) und bei 37 °C und 240 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 wachsen gelassen (ca. 3 h). Den Ansatz wurde für 30 min auf Eis abgekühlt und die Zellen bei 4.000 x g; 4 °C für 15 min pelletiert. Der LB-Medium Überstand wurde möglichst vollständig dekantiert. Es folgten Waschschrte mit eiskaltem sterilen dest. H₂O: 2 x 100 ml (1 Vol.) 1 x 50 ml (1/2 Vol.) 1 x 2 ml (1/50 Vol.). Das Pellet wurde jeweils auf Eis vorsichtig resuspendiert und erneut pelletiert. Die Zellen wurden in 300 μ l dest. H₂O (zum Einfrieren in 10% Glycerol) aufgenommen und in 40 μ l Aliquots aufgeteilt.

4.10.10 Elektroporation

Für jeden Ansatz wurden 1 ml steriles SOC-Medium in einem sterilen Reaktionsgefäß auf 37 °C vorgewärmt. Die Küvetten für die Elektroporation sind rechtzeitig auf Eis vorgekühlt worden. Frisch hergestellte elektrokompetente Zellen wurden auf Eis gehalten, eingefrorene Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend sind 1-4 μ l der zu transformierenden, salzfreien DNA dazugegeben worden. Der Ansatz wurde durchmischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde jeder Ansatz

kompetenter Zellen mit der DNA in eine Küvette überführt. Einstellungen an den Geräten:

PULSE CONTROLLER II (BIO Rad)	Widerstand	200 Ω
GENE PULSER II (BIO Rad)	Kapazität	25 μ F
Set Volts	Spannung	2,5 kV

Die Küvette wurde außen mit einem Papiertuch abgetrocknet, mit der „Nase“ nach vorne in den Schieber gestellt und bis zum Anschlag in das Gerät geschoben. Die Felder >Actual Volts< und >Time Const< wurden gleichzeitig gedrückt. Der Widerstandswert der Probe erschien im Display. Er sollte bei 200 Ω liegen, zu hohe Salzkonzentrationen in der Lösung verringern diesen Wert. Er durfte auf keinen Fall unter 100 Ω liegen. >Set Volts< drücken \Rightarrow 2,5 kV (eingestellter Wert) erscheint im Display. Beide roten Knöpfe (Pulse) bis zum Pfeifton gemeinsam gedrückt halten. Sofort nach der Elektroporation wurde mit einer Pipette etwa 400 μ l des vorgewärmten SOC-Mediums in die Küvette gegeben. Anschließend ist das gesamte Volumen der Küvette in das vorgewärmte Reaktionsgefäß mit SOC-Medium überführt worden und die Zellen für 1 h bei 37 °C und 240 rpm regenerieren worden. Im Display leuchtete der Wert für die erhaltene Impulslänge in msec auf. Dieser Wert wurde notiert, da er ein Maß für die Qualität der Transformation ist. Das Optimum lag bei Werten zwischen 4,8 und 5,0. Bei zu geringen Werten war die Salzkonzentration zu hoch und konnte durch eine geringere Menge an eingesetzter DNA reduziert werden. Je nach eingesetzter Menge DNA und dem bei der Transformation erhaltenen Wert für die Impulslänge, wurden 100-400 μ l des Ansatzes auf LB-Antibiotikum-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Bei Mehrfachverwendung der Küvetten wurden diese mit Wasser und Ethanol gereinigt und im trockenen Zustand für 5-10 min mit UV-Licht bestrahlt.

1. Literaturverzeichnis

1. Coughlan, M.P. (1980): Molybdenum and molybdenum containing enzymes. *Pergamon Press. Oxford*
2. Gupta, U.C. (ed) (1997): Molybdenum in Agriculture. *Cambridge University Press*
3. Mendel R.R., Schwarz, G. (1999) Molybdoenzymes and Molybdenum cofactor in Plants. *Crit Rev Plant Sci* 18, 33-69
4. Eilers, T., Schwarz, G., Brinkmann, H., Witt, C., Richter, T., Nieder, J., Koch, B., Hille, R., Hänsch, R. and Mendel, R.R. (2001) Identification and biochemical characterization of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase. A new player in plant sulfur metabolism *J Biol Chem* 276, 46989-46994.
5. Koshiba, T., Saito, E., Ono, N., Yamamoto, N. and Sato, M. (1996) Purification and properties of flavin- and molybdenum containing aldehyde oxidase from coleoptyles of maize *Plant Physiol* 110, 781-789
6. Rieder, J.L. and Walker-Simmons, M.K. (1993) Group 3 late Embryogenesis Abundant proteins in Desiccation-Tolerant Seedlings of Wheat (*Triticum aestivum* L.) *Plant Physiol* 102, 24-36
7. Taylor, I.B., Burbidge, A. and Thompson, A.J. (2000) Control of abscisic acid synthesis *J Exp Bot* 51, 1563-1574
8. Reichert, D.A. and Westerfeld, W.W. (1953) Isolation and identification of the xanthin oxidase factor as molybdenum *J Biol Chem* 203, 915-923
9. Mahler, H.R., Mackler, B. and Green, D.E. (1954) Studies on metallo-flavoproteins.III. Aldehydoxidase: A molybdoflavoprotein *J Biol Chem* 210, 465-480
10. Nicholas, D.J.D., Nason, A. and McElroy, W.D. (1954) Molybdenum and nitrate reductase.I. Effects of molybdenum deficiency on the neurospora enzymes. *J Biol Chem* 207, 341-351
11. Cohen, H.J., Fridovich, I., Rajagopalan, K.V. (1971) Hepatic sulfite oxidase. A functional role for molybdenum. *J Biol Chem* 246, 374-382
12. Hille, R. (1996) Structure and function of mononuclear molybdenum enzymes. *J Biol Inorg. Chem* 1, 397-404
13. Hille, R. (1996) The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem Rev.* 96, 2757-2816
14. Kisker, C., Schindelin, H. and Rees, D.C. (1997) Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism. *Annu Rev Biochem* 66, 233-267

15. Cove, D.J. and Pateman, J.A. (1963) Independently segregation genetic loci concerned with nitrate reductase activity in *Aspergillus nidulans* *Nature* 198, 262-263
16. Pateman, J.A., Cove, D.J., Rever, B.M. and Roberts, D.B. (1964) A common cofactor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase which also regulates the synthesis of nitrate reductase *Nature* 201, 58-60
17. Sorger, G.J. and Giles, N.H. (1965) Genetic control of nitrate reductase in *Neurospora crassa* *Genetics* 52, 777-788
18. Tomsett, A.B. and Garrett, R.H. (1980) The isolation and characterization of mutants defective in nitrate assimilation in *Neurospora crassa*. *Genetics* 95, 649-660
19. Glaser, J.H. and DeMoss, J.A. (1971) Phenotypic restoration by molybdate of nitrate reductase activity in *chlD* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 108, 854-860
20. Warner, C.K. and Finnerty, V. (1981) Molybdenum hydroxylases in *Drosophila*. II Molybdenum cofactor in xanthine dehydrogenase, aldehyde oxidase and pyridoxal oxidase. *Mol Gen Genet* 184
21. Müller, A.J. and Mendel, R.R. (1989) in *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation* (Wray, J.L. and Kingdom, J.R. eds), pp.166-185, Oxford University Press, Oxford
22. Nason, A., Lee, K.Y., Pan, S.S., Ketchum, P.A., Lamberti, A., DeVries, J. (1971) *In vitro* formation of assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: nitrate reductase from a *Neurospora* mutant and a component of molybdenum-enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 68, 3242-3246
23. Shah, V.K. and Brill, W.J. (1977) Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 3249-3253
24. Johnson, J.L., Hainline, B.E. and Rajagopalan, K.V. (1980) Characterization of the molybdenum cofactor of sulfite oxidase, xanthine oxidase and nitrate reductase. Identification of a pterin as structural component. *J Biol Chem* 255, 1783-1786
25. Johnson, J.L., Hainline, B.E., Rajagopalan, K.V. and Arison, B.H. (1984) The pterin component of the molybdenum cofactor. Structural characterization of two fluorescent derivatives. *J Biol Chem* 259, 5414-5422
26. Johnson, J.L. and Rajagopalan K.V. (1982) Structural and metabolic relationship between the molybdenum cofactor and urothione. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 6856-6860

27. Kramer, S.P., Johnson, J.L., Ribeiro, A., Millington, D.S. and Rajagopalan K.V. (1987) The structure of the molybdenum cofactor. Characterization of di(carboxamidomethyl)molybdopterin from sulfite oxidase and xanthine oxidase. *J Biol Chem* 262, 16357-16363
28. Romao, M.J., Archer, M., Moura, J.J.G., LeGall, J., Engh, R., Schneider, M., Hof, P., Huber, R. (1995) Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxido reductase from *D. gigans*. *Science* 270, 1170-1176
29. Schindelin, H., Kisker, C., Hilton, J., Rajagopalan, K.V. and Rees, D.C. (1996) The overall fold of *Rhodobacter sphaeroides* DMSO reductase is similar to that of FHD. *Science* 272, 1615-1619
30. Boyington, J.C., Gladyshev, V.N., Khangilov, S.V., Stadtman, T.C. and Sun, P.D. (1997) Crystal structure of formate dehydrogenase H: Catalysis involving Mo, molybdopterin, selenocysteine and Fe₄S₄ cluster. *Science* 275, 1305-1308
31. Johnson, J.L., Bastian, N.R. and Rajagopalan K.V. (1990) Molybdopterin guanine dinucleotide: A modified form of molybdopterin identified in the molybdenum cofactor of dimethyl sulfoxide reductase from *Rhodobacter sphaeroides forma-specialis denitrificans*. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 87, 1390-1394
32. Shanmugam, K.T., Steward, V., Gunsalus, R.P., Boxer, D.H., Cole, J.A., Chippaux, M., DeMoss, J.A., Giordano, G., Lin, E.C. and Rajagopalan, K.V. (1992) Proposed nomenclature for the genes involved in molybdenum metabolism in *Escherichia coli* and *Salmonella thyphimurium* (letter). *Mol Microbiol* 6, 3452-3454
33. Reiss, J., Cohen, N., Dorche, C., Mandel, H., Mendel, R.R., Stallmeyer, B., Zobot, M. T. and Dierks, T. (1998) Mutations in a polycistronic nuclear gene associated with molybdenum cofactor deficiency. *Nat Genet* 20, 51-53
34. Rajagopalan, K.V. and Johnson, J.L. (1992) The pterin molybdenum cofactor. *J Biol Chem* 267, 10199-10202
35. Rajagopalan, K.V. (1996) in *Escherichia coli and Salmonella thyphimurium* (Neidhard, F.C., ed) pp.674-679, ASM Press, Washington DC
36. Mendel, R.R. (1992) in *Plant Biotechnology and Development – Current topics in Plant Molecular Biology* (Gresshoff P.M., ed) Vol.1, pp. 11-16, CRC Press Boca Raton and London
37. Mendel, R.R. and Schwarz, G. (2002) Biosynthesis and Molecular Biology of the Molybdenum Cofactor (Moco) in "Molybdenum and tungsten: their roles in biological processes". *Metal Ions in Biological Systems*, Sigel, A. and Sigel, H. (eds) Dekker, M.: Inc. New York, Vol. 39
38. Brown, G.M. (1985) in *Folates and Pterins* (Blakley, R.L., and Benkovics, S.J., eds) Vol. 2, pp. 299-419, John Wiley & Sons, New York

-
39. Bacher, A., (1990) in *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* (Müller, F., ed) Vol.1, pp.215-259, CRC-press, Boca Raton
40. Johnson, J.L, Wuebbens, M.M. and Rajagopalan, K.V. (1989) The structure of a molybdopterin precuros. Characterization of a stable, oxidized derivative. *J Biol Chem* 264, 13440-13447
41. Wuebbens, M.M. and Rajagopalan, K.V. (1995) Investigation of the early steps of molybdenum biosynthesis in *Escherichia coli* through the use of *in vivo* labelling studies. *J Biol Chem* 270, 1082-1086
42. Santamaria-Araujo, J.A., Fischer, B., Otte, T., Nimtz, M., Mendel, R.R. and Schwarz, G. (2004) The Tetrahydropyranopterin Structure of the Sulfur-free and Metal-free Molybdenum Cofactor Precursor. *J Biol Chem* 279, 15994-15999
43. Menendez, C., Siebert, D., and Brandsch, R. (1996) MoaA of *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1 involved in Mo-pterin cofactor synthesis is an Fe-S protein. *FEBS Lett* 391, 101-103
44. Hoff, T., Schnorr, K.M., Meyer, C. and Caboche, M. (1995) Isolation of two *Arabidopsis* cDNAs involved in early steps of molybdenum cofactor niosynthesis by functional complementation of *Escherichia coli* mutants. *J Biol Chem* 270, 6100-6107
45. Reiss, J., Christensen, E., Kurlemann, G., Zobot, M.-T. and Dorche, C. (1998) genomic structure and mutational spectrum of the bicistronic MOCS1 gene defective in molybdenum cofactor deficiency type. *A Hum Genet* 103, 639-644
46. Sofia, H.J., Chen, G., Hetzler, BG., Reyes.Spindola, J.F., Miller ,N.E. (2001) Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved Stepps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization. *Nucleic Acids Res.* 29, 1097-1106
47. Hänzelmann, P., Schwarz, G. and Mendel, R.R. (2002) Functionality of alternative splice forms of the first enzymes involved in human molybdenum cofactor biosynthesis. *J Biol Chem* 18303-18312
48. Wuebbens, M.M., Liu, M.T.W., Rajagopalan, K.V. and Schindelin, H. (2000) Insights into molybdenum cofactor deficiency provided by the crystal structure of the molybdenum cofactor biosynthesis protein MoaC. *Structure* 8, 709-718
49. Johnson, M.E, and Rajagopalan, K.V.(1987) *In vitro* system for molybdopterin biosynthesis. *J Bacteriol* 169, 110-116
50. Johnson, M.E, and Rajagopalan, K.V.(1987) Involvement of *chlA*, *E,M* and *N* loci in *Escherichia coli* molybdopterin biosynthesis. *J Bacteriol* 169, 117-125

51. Gutzke, G., Fischer, B., Mendel, R.R. and Schwarz, G. (2001) Thiocarboxylation of molybdopterin synthase provides evidence for the mechanism of dithiolene formation in metal-binding pterins. *J Biol Chem* 276, 36268-36274
52. Rudolph, M.J., Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K.V. and Schindelin, H. (2001) Crystal structure of molybdopterin synthase and its evolutionary relationship to ubiquitin activation. *Nat Struct Biol* 8, 42-46
53. Pitterle, D.M. and Rajagopalan, K.V. (1993) The biosynthesis of molybdopterin in *Escherichia coli*. Purification and characterization of the converting factor. *J Biol Chem* 268, 13499-13505
54. McGrath, J.P., Jentsch, S. and Varshavsky, A. (1991) *Uba 1*: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *EMBO J* 10, 227-236
55. Rajagopalan, K.V. (1997) Biosynthesis and processing of the molybdenum cofactor *Biochem Soc Trans* 25, 757-761
56. Lake, M.W., Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K.V. and Schindelin, H. (2001) Mechanism of ubiquitin activation revealed by the structure of a bacterial MoeB-MoaD complex *Nature* 414, 325-329
57. Leimkühler, S. and Rajagopalan, K.V. (2001) A sulfurtransferase is required in the transfer of cysteine sulphur in the *in vitro* synthesis of molybdopterin from precursor Z in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276, 22024-22031
58. Matthies, A., Rajagopalan, K.V., Mendel, R.R. and Leimkühler, S. (2004) Evidence for the physiological role of a rhodanese-like protein for the biosynthesis of the molybdenum cofactor in humans. *PNAS* 101, 5946-5951
59. Rech, S., Deppenmeier, U. and Gunsalus, R.P. (1995) Regulation of the molybdate transport operon, *modABCD*, of *Escherichia coli* in response to molybdate availability. *J Bacteriol* 177, 1023-1029.
60. Liu, M.T., Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K.V. and Schindelin, H. (2000) crystal structure of the gephyrin-related molybdenum cofactor biosynthesis protein MogA from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275, 1814-1822
61. Xiang, S., Nichols, J., Rajagopalan, K.V., Schindelin, H. (2001) The crystal structure of *Escherichia coli* MoeA and its relationship to the multifunctional protein gephyrin. *Structure* 9, 299-310
62. Joshi, M. S., Johnson, J.L. and Rajagopalan, K.V. (1996) Molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli* *mod* and *mog* mutants. *J Bacteriol* 178, 4310-4312
63. Steward, V. and MacGregor, C.H. (1982) Nitrate reductase in *Escherichia coli* K-12: involvement of *chlC*, *chlE* and *chlG* loci. *J Bacteriol* 151, 788-799

-
64. Hasona, A., Ray, R.M. and Shanmugam, K.T. (1998) Physiological and genetic analyses leading to identification of a biochemical role for the *moeA* (molybdate metabolism) gene product in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180, 1466-1472
65. Stallmeyer, B., Nerlich, A., Schiemann, J., Brindkmann, H. and mendel, R.R. (1995) Molybdenum cofactor biosynthesis: the *Arabidopsis thaliana* cDNA *cnx1* encodes a multifunctional two-domain protein homologous to a mammalian neuroprotein, the insect protein Cinnamon and three *Escherichia coli* proteins. *Plant J* 8, 751-762
66. Prior, P., Schmitt, B., Grenningloh, G., Pribilla, I., Multhaupt, G., Beyreuther, K., Maulet, Y., Werner, P., Langosch, D., Kirsch, J. (1992) Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuro. 8*, 1161-1170
67. Schwarz, G., Boxer, D.H. and Mendel, R.R. (1997) Molybdenum biosynthesis. The plant protein Cnx1 binds molybdopterin with high affinity *J Biol Chem* 272, 26811-26814
68. Kuper, J., Palmer, T., Mendel, R.R., Schwarz, G. (2000) Mutations in the molybdenum cofactor biosynthetic protein Cnx1G from *Arabidopsis thaliana* define functions for molybdopterin binding, molybdenum insertion, and molybdenum cofactor stabilization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 6475-6480
69. Kuper, J., Winking, J., Hecht, H.J., Mendel, R.R. and Schwarz, G. (2003) The active site of the molybdenum cofactor biosynthetic protein Cnx1G. *Arch Biochem Biophys* 411
70. Leimkühler, S., Wuebbens, M.M. and Rajagopalan, K.V. (2001) Characterization of *Escherichia coli* MoeB and Its Involvement in the Activation of Molybdopterin Synthase for the Biosynthesis of the Molybdenum Cofactor. *J Biol Chem* 276, 34695-34701
71. Palmer, T., Vasishita, Whitty, W.P. and Boxer, D.H. (1994) Isolation of protein FA, a product of the *mob* locus required for molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 222, 687-692
72. Palmer, T., Santini, C.L., Iobbi Nivol, C., Eves, D.J., Boxer D.H. and Giordano, G. (1996) Involvement of *narJ* and *mob* gene products in the distinct steps in the biosynthesis of the molybdoenzyme nitrate reductase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 20, 875-884
73. Temple, C.A. and Rajagopalan, K.V. (2000) Mechanism of assembly of the Bis(Molybdopterin guanine dinucleotide)molybdenum cofactor in *Rhodobacter sphaeroides* dimethyl sulfoxide reductase. *J Biol Chem* 275, 40202-40210
74. Westley, J. (1977) Sulfane-transfer catalysis by enzymes, in: *Bioorganic Chemistry*, Vol.1, edited by E.E. van Tamelen. pp.371-390. Orlando, FL, USA; Academic Press

75. Westley, J. (1980) Rhodanases and the sulfane pool, in *The Enzymatic Basis of Detoxification* (Jakoby, W.B., Ed.), Vol.2, pp.245-261, Academic Press, New York
76. Westley, J., Adler, H., Westley, L. and Nishida, C. (1983) The sulfurtransferases. *Fundam Apl Toxicol* 3, 377-382
77. Nagahara, N., Okazaki, T. and Nishino, T. (1995) Cytosolic mercaptopyruvate sulfurtransferase is evolutionarily related to mitochondrial Rhodanese. *J Biol Chem*, 270, 16230-16235
78. Lang, K. (1933) *Biochem* 259,243
79. Luo, G.-X. and Horowitz, P.M. (1994) The sulfurtransferase activity and structure of rhodanese are affected by site-directed replacement of Arg186 and Lys249. *J Biol Chem*, 269, 399-408
80. Nandi, D.L., Horowitz, P.M. and Westley, J. (2000) Rhodanese as thioredoxin oxidase. *Int J Biochem Cell Biol.*, 32, 465-473
81. Ploegmann, J.H., Drent, G., Kalk, K.H., Hol, W.G.J., Heinrikson, R.L., Keim, P., Weng, L. and Russel, J. (1978) The covalent and tertiary structure of bovine liver Rhodanese. *Nature* 273, 124-129
82. Bordo, D., Deriu, D., Colnaghi, R., Carpen, A., Pagani, S. and Bolognesi, M. (2000) The crystal structure of a sulfurtransferase from *Azotobacter vinelandii* highlights the evolutionary relationship between the rhodanese and phosphatase enzyme families. *J Mol Biol* 298, 691-704
83. Ray, W.K., Zeng, G., Potters, M.B., Mansuri, A.M. and Larson, T.J. (2000) Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *J Bacteriol* 182, 2277-2284
84. Spallarossa, A., Donahue, J., Larson, T.J., Bolognesi, M. and Bordo D. (2001) *Escherichia coli* GlpE is a prototype sulfurtransferase for the single-domain rhodanese homology superfamily. *Structure* 9, 1117-1125
85. Faumann, E.B., Cogswell, J.P., Lovejoy, B., Rocque, W.J., Holmes, W., Montana, V.G., Piwnica-Worms, H., Rink, M. and Saper, M.A. (1998) Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A. *Cell* 93, 617-625
86. Reynolds, R.A., Yem, A.W., Wolfe, C.L., Deibel, M.R., Jr, Chidester, C.G. and Watenpaugh, K.D. (1999) Crystal structure of the catalytic subunit of Cdc25B required for G₂/M phase transition of the cell cycle. *J Mol Biol* 293, 559-568
87. Sörbös, B.H. (1957) Sulfite and complex-bound cyanide as sulphur acceptors for rhodanases. *Acta Chem Scand* 11, 628-633
88. Pagani, S., Bonomi, F. and Cerletti, P. (1984) Enzymic synthesis of the iron-sulfur cluster of spinach ferredoxin. *Eur J Biochem* 142, 361-366

89. Westley, J. (1998) Depletion of the sulphane pool: toxicology implications. In Damiani, L.A. (ed.) *Sulphur-containing Drugs and Related Organic Compounds*, Vol. 2B, J. Wiley & Sons, New York, NY, pp.87-99
90. Ogasawara, Y., Lacourcierre, G. M. and Stadtman, T.C. (2001) Formation of a selenium-substituted rhodanese by reaction with selenite and glutathione: possible role of a protein perselenide in a selenium delivery system. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 9494-9498
91. Wolfe, M.D., Ahmed, F., Lacourcierre, G. M., Lauhon, C.T., Stadtman, T.C. and Larson, T. (2004) Functional Diversity of the Rhodanese Homology Domain: the *Escherichia coli ybbB* gene encodes a selenophosphate-dependent tRNA 2-selenouridine synthase. *J Biol Chem* 279, 1801-1809
92. Keyse, S.M. and Ginsburg, M. (1993) Amino acid sequence similarity between CL100, a dual specific MAP kinase phosphatase and Cdc25. *Trend Biochem Sci* 18, 377-378
93. Palenchar, P.M., Buck, C.J., Cheng, H., Larson, T.J. and Mueller, E.G. (2000) Evidence that Thil, an enzyme shared between thiamine and 4-thiouridine biosynthesis, may be a sulfurtransferase that proceed through a persulfide intermediate. *J Biol Chem* 275, 8283-8286
94. Brissette, J.L., Russel, M., Weiner, L. and Model, P. (1990) Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 862-866
95. Kleerebezem, M., Crielgaard, W. and Tommassen, J. (1996) Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) of *Escherichia coli* in maintenance of the protonmotive force under stress conditions. *EMBO J* 15, 162-171
96. Adams, H., Teertstra, W., Koster, M., Tommassen, J. (2002) PspE (phage-shock protein E) of *Escherichia coli* is a Rhodanese. *FEBS Lett.* 518, 173-176
97. Mueller, E.G., Palenchar, P.M. and Buck, C.J. (2001) The role of the Cysteine Residues of Thil in the Generation of 4-Thiouridine in tRNA. *J Biol Chem* 276, 33588-33595
98. Spallarossa, A., Forlani, F., Carpen, A., Armirotti, A., Pagani, S., Bolognesi, M. and Bordo, D. (2003) The "rhodanese" fold and catalytic mechanism of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferases: crystal structure of SseA from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 335, 583-593
99. Bordo, D. and Bork, P. (2002) The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO reports* 3, 741-746
100. Johnson, J.L. and Wadman, S.K. (1995) *The metabolic and molecular bases of inherited disease* (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D., eds.) McGraw-Hill, New York, 2271-2283

101. Kuper, J., Llamas, A., Hecht, H.-J., Mendel, R.R. and Schwarz, G (2004) Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature* 430, 803-806
102. Llamas, A., Mendel, R.R. and Schwarz, G. (2004) Synthesis of Adenylated Molybdopterin. *J Biol Chem* 279, 55241-55246
103. Wuebbens, M. and Rajagopalan, K.V. (2003) Mechanistic and Mutational Studies of *Escherichia coli* Molybdopterin Synthase Clarify the Final Step of Molybdopterin Biosynthesis. *J Biol Chem* 278, 14523-14532
104. Varshavsky, A. (1997) The ubiquitin system. *Trends Biochem Sci* 22, 383-387
105. Begley, T.P., Downs, D.M., Ealick, S.E., McLafferty, F.W., Van Loon, A.P.G.M., Taylor, S., Campobasso, N., Chiu, H.-J., Kinsland, C., Reddick, J.J., Xi, J. (1999) Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch Microbiol* 171, 293-300
106. Wang, C., Xi, J., Begley, T.P. and Nicholson, L.K. (2001) Solution structure of ThiS and implication for the evolutionary roots of ubiquitin. *Nature structural biology* 8, 47-50
107. Lauhon, C.T. and Kambampati, R. (2000) The *isc* gene in *Escherichia coli* is required for the biosynthesis of 4-thiouridine, thiamine and NAD. *J Biol Chem* 275, 20096-20103
108. Kambampati, R. and Lauhon, C.T. (2000) Evidence for the Transfer of Sulfane Sulfur from IscS to ThiI during the in vitro Biosynthesis of 4-Thiouridine in *Escherichia coli* tRNA. *J Biol Chem* 275, 10727-10730
109. Mueller, E.G., Buck, C.J., Palenchar, P.M., Barnhart, L.E. and Paulson, J.L. (1998) Identification of a gene involved in the generation of 4-thiouridine in tRNA. *Nucleic Acids Res* 26, 2606-2610
110. Schwartz, C.J., Djaman, O., Imlay, J.A. and Kiley, P.J. (2000) The cysteine desulfurase IscS has a major role in *in vivo* Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 192, 9009-9014
111. Tokumoto, U. and Takahashi, Y. (2001) Genetic analysis of the *isc* operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *J Biochem (Tokyo)* 130, 63-70
112. Lauhon, C.T. (2002) Requirement for IscS in Biosynthesis of All Thionucleosides in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184, 6820-6829
113. Mihara, H. and Esaki, N. (2002) Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 12-23

114. Zengh, L. and Dean, D.R. (1994) *J Biol Chem* 296,18723-18726
115. Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T., Soda, K., Esaki, N. (1997) Cysteine sulfinatase, a NIFS-like protein of *Escherichia coli* with selenocysteine lyase and cysteine desulfurase activities. Gene cloning, purification, and characterization of a novel pyridoxal enzyme. *J Biol Chem* 272, 22417-22424
116. Mihara, H., Maeda, M., Fujii, T., Kurihara, T., Hata, Y. and Esaki, N. (1999) A NifS-like gene, *csdB* encodes an *Escherichia coli* counterpart of mammalian selenocysteine lyase. Gene cloning, purification, characterization and preliminary x-ray crystallographic studies. *J Biol Chem* 274, 14768-14772
117. Loiseau, L., Ollagnier-De-Choudens, S., Nachin, L., Fontecave, M. and Barras, F. (2003) Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system : SufS and SufE form a new type of cysteine Desulfurase. *J Biol Chem* 278, 38352-38359
118. Outten, F.W., Wood, M.J., Munoz, F.M. and Storz, G. (2003) The sufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *E. coli*. *J Biol Chem* 278, 45713-45719
119. Bradford, M.M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
120. Laemmli, K.K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227,680-685
121. Temple, C.A., Graf, T.N., Rajagopalan, K.V.(2000) Optimizing of expression of human sulfite oxidase and its molybdenum domain. *Arch Biochem Biophys* 383, 281-287
122. Gully, D., Moinier, D., Loiseau, L., Bouveret, E. (2003) New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification. *FEBS Lett* 548, 90-96
123. Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado- Nilsson, E., Wilm, M., and Séraphin, B. (2001) The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. *Methods* 24, 218-229
124. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557
125. Donahue, J.L., Bownas, J.L., Niehaus, W.G., Jr., and Larson, T.J. (2000) Purification and characterization of glpX-encoded fructose 1, 6-bisphosphatase, a new enzyme of the glycerol 3-phosphate regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182, 5624-562

126. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1998) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
127. Gill, G.C., Hippel P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficient from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-326
128. James, P., Halladay, J. and Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient repression of GAL gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14, 3834-3841
129. Del Sal, G., Mantioletti, G., Schneider, C. (1989) The CTAB-DNA precipitation method: a common miniscale preparation of template DNA of phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Bio-Techniques* 7, 514-519
130. Westley J., (1973) Rhodanese. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 39,327-368
131. Lester, R.L. and DeMoss, J.A. (1971) Effects of molybdate and selenite on formate and nitrate metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 105,1006-1014
132. Jones, R.W., Garland, P.B. (1977) Sites and specificity of the reaction of bipyridylum compounds with anaerobic respiratory enzymes of *Escherichia coli*. Effects of permeability barriers imposed by the cytoplasmic membrane. *Biochem J* 164, 199-211
133. Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 189, 113-30.
134. Hama, H., Kayahara, T., Ogawa, W., Tsuda, M. and Tsuchiya, T. (1994) Enhancement of serine-sensitivity by a gene encoding rhodanese-like protein in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 115, 1135-1140
135. Colnaghi, R., Cassinelli, G., Drummond, M., Forlani, F., Pagani, S. (2001) Properties of the *Escherichia coli* rhodanese-like protein SseA: contribution of the active-site residues Ser240 to sulphur donor recognition. *FEBS Lett.* 500, 153-156
136. Pecci, L., Pensa, B., Costa, M., Cignini, P.L. and Canella, C. (1976) Reaction of Rhodanese with Dithiothreitol. *Biochimica et Biophysica Acta* 445, 104-111
137. Horowitz, P.M. and Criscimagna, N.L., (1983) The use of intrinsic protein fluorescence to quantitate enzyme-bound persulfide and to measure equilibria between intermediates in rhodanese catalysis. *J Biol Chem.* 258, 7894-7896

138. Canella, C., Berni, R., Rosato, N. and Finazzi-Agrò, A. (1986) Active site modifications quench intrinsic fluorescence of rhodanese by different mechanisms. *Biochemistry* 25, 7319-7323
139. Tiroide F., Malaguti C., Romero, F., Attar, R., Camonis, J., Egly, J.M. (1997) A conditionally expressed third partner stabilizes or prevents the formation of a transcriptional activator in a three-hybrid system. *J Biol Chem.* 272, 22995-22999
140. Brachmann, R. and Boeke, J. (1997) Tag games in yeast: the two hybrid system and beyond. *Curr Opin Biotechnol.* 8, 561-568
141. Yokota, H., Mori, K., Kaniwa, H. and Shibamura T. (2000) Elimination of Artifactual Bands from Polyacrylamide Gels. *Anal Biochem* 280, 188-189
142. Flint, D.H. (1996) *Escherichia coli* Contains a Protein That Is Homologous in Function and N-terminal Sequence to the Protein Encoded by the nifS Gene of *Azotobacter vinelandii* and That Can Participate in the Synthesis of the Fe-S Cluster of Dihydroxy-acid Dehydratase. *J Biol Chem.* 271, 16068-16074
143. Schneider, F., Krämer, R., Burkovski, A. (2004) Identification and characterization of the main β -alanine uptake system in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 65, 576-582
144. Wargel, R.J., Shadur, C.A., Neuhaus, F.C. (1970) Mechanism of D-cycloserine action: transport system for D-alanine, D-cycloserine, L-alanine and glycine. *J Bacteriol* 103, 778-788
145. Kramer, G., Ramachandiran, V., Horowitz, P. and Hardesty, B. (2001) An Additional Serine Residue at the C Terminus of Rhodanese Destabilizes the Enzyme. *Arch Biochem Biophys* 385, 332-337
146. Ploegmann, J.H., Drent, G., Kalk, K.H. and Hol, W.G.J. (1979) The structure of bovine liver Rhodanese. II. The active site in the sulfur-substituted and sulphur-free enzyme. *J Mol Biol* 127, 149-162

6. Anhang

6.1 Primer

Tab.6.1 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer

Nr.	Primer	Basenfolge 5'→3'	Verwendung
1.	MoeB-5'Eco RI	GAA TTC ATG GCG GAA CTC AGC GAT CAG G	Klonierung <i>moeB</i> in pBridge
2.	MoeB-3'Bam HI	GGA TCC TTA CTG CCC ACA CAC CTC ACC	Klonierung <i>moeB</i> in pBridge
3.	MoeB-5'Not I	GCG GCC GCA ATG GCG GAA CTC AGC	Klonierung <i>moeB</i> in pBridge
4.	MoeB-3'Bgl II	AGA TCT TTA CTG CCC ACA CAC CTC ACC	Klonierung <i>moeB</i> in pBridge
5.	MoaD2-5'Eco RI	GAA TTC ATG ATT AAA GTT CTT TTT TTC GCC C	Klonierung <i>moaD</i> in pBridge
6.	MoaD-3'BamHI	GGA TCC TTA ACC TCC GGT TAC CGG CG	Klonierung <i>moaD</i> in pBridge
7.	MoaD-5'Not I	GCG GCC GCA ATG ATT AAA GTT CTT TTT TTC GCC C	Klonierung <i>moaD</i> in pBridge
8.	MoaD-3'Bgl II	AGA TCT TTA ACC TCC GGT TAC CGG CG	Klonierung <i>moaD</i> in pBridge
9.	IscS-5'Eco RI	GAA TTC ATG AAA TTA CCG ATT TAT CTC G	Klonierung von <i>iscS</i> in pet15b, pGADT7, pGBKT7
10.	IscS-3'BamHI	GGA TCC TTA ATG ATG AGC CCA TTC GAT GC	Klonierung von <i>iscS</i> in pet15b, pGADT7, pGBKT7
11.	CSD-5'Eco RI	GAA TTC ATG AAC GTT TTT AAT CCC GCG C	Klonierung von <i>csdA</i> in pGADT7, pGBKT7
12.	CSD-3'BamHI	GGA TCC TTA ATC CAC CAA TAA TTC CAG CGC GC	Klonierung von <i>csdA</i> in pGADT7, pGBKT7
13.	GlpE-5'Eco RI	GAA TTC ATG GAT CAG TTC GAA TGT ATT AAC G	Klonierung von <i>glpE</i> in pet15b; pGADT7, pGBKT7
14.	GlpE-3'BamHI	GGA TCC TTA CGC GCC GTA CGC CAC C	Klonierung von <i>glpE</i> in pet15b; pGADT7, pGBKT7
15.	CSD-5'NcoI -His	CCG CGC GGC AGC CCA TGG ACG	Klonierung von <i>csdA</i> in den pet15b (ohne His-tag)
17.	pBridge-MCS I for	TCA TCG GAA GAG AGT AG	zur Sequenzierung der MCS I des pBridge Vektors
18.	pBridge-MCS I rev	CGT TTT AAA ACC TAA GAG TCA	zur Sequenzierung der MCS I des pBridge Vektors
19.	pBridge-5'MCS II	GCC TGA CTA TGC CAG CGA TCT CC	zur Sequenzierung der MCS II des pBridge Vektors
20.	pBridge-3'MCS II	GCA CCA CCA CCA GTA GAG	zur Sequenzierung der MCS II des pBridge Vektors
28.	Thil 5'-NcoI	CCA TGG AGT TTA TCA TTA AAT TGT TCC CG	Klonierung von <i>thil</i> in pet15b (ohne His-tag)
29.	Thil 3'-BamHI	GGA TCC TTA CGG GCG ATA TAC C	Klonierung von <i>thil</i> in pet15b
30.	sseA 5'-NdeI	CAT ATG CGT GAG AAT TTA CG	Klonierung von <i>sseA</i> in pet15b
31.	sseA 3'-BamHI	GGA TCC TTA TTT CAC TGG	Klonierung von <i>sseA</i> in pet15b
32.	pspE 5'-NdeI	CAT ATG TTT AAA AAA GGC	Klonierung von <i>pspE</i> in pGADT7, pGBKT7
33.	pspE 3' BamHI	GGA TCC TTA ACC TTT GAC CTT CGG	Klonierung von <i>pspE</i> in pGADT7, pGBKT7
35.	ynjE 3'-BamHI	GGA TCC TTA TTT GCT ACT GTC CGG	Klonierung von <i>ynjE</i> in pGADT7, pGBKT7

36.	yceA 5'-NdeI	CAT ATG CCA GTG TTA CAC AAC CGC	Klonierung von yceA in pGADT7, pGBKT7
37.	yceA 3'-BamHI	GGA TCC TTA TTC TGT TGG ATC AGG	Klonierung von yceA in pGADT7, pGBKT7
38.	MoaE 5'-EcoRI	GAA TTC ATG GCA GAA ACC	Klonierung von moaE in pGADT7, pGBKT7
39.	MoaE 3'-BamHI	GGA TCC CTA CCA GCG TTT TGC CGC	Klonierung von moaE in pGADT7, pGBKT7
40.	ynjE 5'-EcoRI	GAA TTC ATG AAA CGT GTT TCT C	Klonierung von ynjE in pGADT7, pGBKT7
43.	sseA 5'-EcoRI	GAA TTC ATG CGT GAG AAT TTA CG	Klonierung von sseA in pGADT7, pGBKT7
45.	Pet15Prom	CGA TCC CGC GAA ATT AAT ACG	Zur Sequenzierung des pet15 Vektors
46.	MoaD5'Sall	CG GTC GAC ATG ATT AAA GTT CTT TTT TTC GCC C	Klonierung des TAPmoaD Konstruktes
47.	MoaD3'HindIII	GC AAG CTT TTA ACC TCC GGT TAC CGG	Klonierung des TAPmoaD Konstruktes
48.	MoeB5'Sall	GC <u>GTC GAC</u> ATG GCG GAA CTC AGC G	Klonierung des TAPmoeB Konstruktes
49.	MoeB3'HindIII	CG AAG CTT TTA CTG CCC ACA CAC C	Klonierung des TAPmoeB Konstruktes
50.	pBAD 5' TAP	CTG TTT CTC CAT ACC CGT T	Zur Sequenzierung des pEB327 Vektors (pBAD24)
54.	TAP_5_Sall	G ATC TCA TCC TCC GGG GCA CTT G	Zur Sequenzierung des pEB327 Vektors (pBAD24)
57.	YgaP5'NdeI	CC CAT ATG GCT TTG ACA ACC	Klonierung von YgaP in pGADT7, pGBKT7
58.	YgaP3'Rhod. BamHI	GG GGA TCC TTA CTG GCG CAT TAA CGG	Klonierung von YgaPR in pGADT7, pGBKT7
59.	YgaP3'TM BamHI	CC GGA TCC TCA AGC TCG TTG GTT CC	Klonierung von YgaP in pGADT7, pGBKT7
60.	PspE5'NdeI-2	CAT ATG CAC TGG ATC GAT G	Klonierung von PspE in pGADT7, pGBKT7
61.	YnjE 5'Eco RI	GGG AAT <u>TCG</u> ATG TCG GGA TTT TCG	Klonierung von YnjE in pACYCDuett-1
62.	YnjE 3'Not I	CC <u>GC GGC CGC</u> TTA TTT GCT ACT GTC CGG GCC	Klonierung von YnjE in pACYCDuett-1

6.2 Plasmide

Tab. 6.2 Liste der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte

Bezeichnung	Plasmid	Schnittstelle
pAF 01	pBS moaD	EcoRI / BamHI
pAF 02	pBS moeB	NotI / BglII
pAF 03	pBS moaD	NotI / BglII
pAF 04	pBS moeB	EcoRI / BamHI
pAF 05	pBS csd	EcoRI / BamHI
pAF 06	pBS iscS	EcoRI / BamHI
pAF 07	pet15b moaD/E	NcoI/BamHI
pAF 08	pet15b moeB	NcoI/BamHI
pAF 09	pet15b moaD	NcoI/BamHI
pAF 10	pGEM-T Easy csd - His	NcoI/BamHI
pAF 11	pGADT7 iscS	EcoRI/BamHI
pAF 12	pBridge moaD	NotI/BglII
pAF 13	pBridge moeB	NotI/BglII
pAF 14	pBS glpE	EcoRI/BamHI
pAF 15	pet15b csd (ohne His-Tag)	NcoI/BamHI
pAF 16	pBridge moaD –	(NotI/BglII)

	moeB	(EcoRI/BamHI)
pAF 17	pBridge moeB- moaD	(NotI/BglII) (EcoRI/BamHI)
pAF 18	pGADT7 glpE	EcoRI/BamHI
pAF 19	pet15b glpE	NdeI/BamHI
pAF 20	pGBKT7 moaD	EcoRI/BamHI
pAF 21	pGADT7 moaD	EcoRI/BamHI
pAF 22	pGADT7 moeB	EcoRI/BamHI
pAF 23	pBS sseA	NdeI/BamHI
pAF 24	pBS Thil ohne His	NcoI/BamHI
pAF 25	pet15b Thil ohne His	NcoI/BamHI
pAF 26	pet15b sseA	NdeI/BamHI
pAF 27	pGBKT7 glpE	EcoRI/BamHI
pAF 28	pBS pspE	NdeI/BamHI
pAF 29	pGBKT7 iscS	EcoRI/BamHI
pAF 30	pBS moaE	EcoRI/BamHI
pAF 31	pGBKT7 moaE	EcoRI/BamHI
pAF 32	pGADT7 moaE	EcoRI/BamHI
pAF 33	pGBKT7 yceA	NdeI/BamHI
pAF 34	pGBKT7 pspE	NdeI/BamHI
pAF 35	pGADT7 pspE	NdeI/BamHI
pAF 36	pGBKT7 csdB	NdeI/BamHI
pAF 37	pTrc sseA	NdeI/BamHI
pAF 38	pGEM-T-Easy moeB	Sall/HindIII
pAF 39	pGEM-T-Easy moaD	Sall/HindIII
pAF 40	pEB327 moaD	Sall/HindIII
pAF 41	pEB327 moeB	Sall/HindIII
pAF 45	pBS ygaP (ganzes Protein)	NdeI/BamHI
pAF 46	pBS YgaP-Rhod.Domäne	NdeI/BamHI
pAF47	pet15b ygaP	NdeI/BamHI
pAF 48	pet15b ygaP-Rhod. Domäne	NdeI/BamHI
pAF 49	pBS PspE_Rhod. Domäne	NdeI/BamHI
pAF 50	pet15b PspE-Rhod.Domäne	NdeI/BamHI
pAF 52	pGBKT7 moeB	EcoRI/BamHI
pAF 53	pGADT7 csd	EcoRI/BamHI
pAF 54	pBS yceA	NdeI/BamHI
pAF 55	pet15b yceA	NdeI/BamHI
pAF 56	pBS thil	NcoI/BamHI
pAF 57	pet15b pspE (ganzes Protein)	NdeI/BamHI
pAF 58	pBS ynjE	EcoRI/NotI
pAF 59	pACYCDuet-1 ynjE	EcoRI/NotI
pAF 60	pBS ynjE	SphI
pAF 61	pGADT7 ygaP (ganzes Protein)	NdeI/BamHI
pAF 62	pEB327 ynjE	SphI
pAF 63	pGADT7 yceA	NdeI/BamHI
pAF 64	pGADT7 thil	NdeI/BamHI
pAF 65	pGBKT7 ygaP (ganzes protein)	NdeI/BamHI
pAF 66	pGADT7 sseA	EcoRI/NdeI
pAF 67	pGBKT7 sseA	EcoRI/NdeI
pAF 68	pGBKT7 thil	NdeI/BamHI
pAF 69	pBS ynjE	EcoRI/BamHI
pAF 70	pGADT7 ynjE	EcoRI/BamHI
pAF 71	pGBKT7 ynjE	EcoRI/BamHI

Zusammenfassung

Der Molybdäncofaktor (Moco) ist mit seiner universellen Funktion ein essentieller Bestandteil aller Molybdoenzyme, mit Ausnahme der Nitrogenase. Die Grundstruktur in Pro- und Eukaryoten besteht aus dem Molybdopterin (MPT), einem Pterin mit einer einzigartigen Dithiolengruppe, an die das Molybdän-Atom gebunden ist. Die Synthese des Molybdäncofaktors kann, beginnend mit der Konversion von GTP zu dem stabilen Intermediat Precursor Z in drei Schritte unterteilt werden. Im zweiten Schritt findet die Umwandlung von Precursor Z zu Molybdopterin statt, bevor im letzten Schritt das Molybdän an die Dithiolengruppen des MPT inseriert wird. Die *E. coli* MPT-Synthase ist ein Heterotetramer aus zwei kleinen (MoaD) und zwei großen (MoaE) Untereinheiten. Um katalytisch aktiv zu sein, muss MoaD in thiocarboxylierter Form vorliegen. Die Identifizierung des dafür verantwortlichen schwefelübertragenden Proteins stand im Mittelpunkt dieser Arbeit. Im Hefe Tri-Hybrid-System konnten keine neuen spezifischen *in vivo* Interaktions-Partner von MoeB und MoaD identifiziert werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass weder eine der L-Cystein Desulfurasen IscS, CSD oder CsdB, noch eine der bislang acht bekannten Rhodanese-ähnlichen Proteine essentiell für die Thiocarboxylierung von MoaD in *E. coli* beteiligt ist. Allerdings konnte mit Hilfe der Tandem-Affinity-Purification (TAP)-Methode in *E. coli* eine *in vivo* Interaktion zwischen MoeB und dem Rhodanese-ähnlichen Protein YnjE identifiziert werden. Dass es sich dabei um eine spezifische Interaktion handelt wurde in Immunpräzipitationsanalysen mit MoeB und verschiedenen *E. coli* Rhodanesen, sowie weiteren biochemischen Untersuchungen mit gereinigtem YnjE bestätigt. Neben YnjE ist auch die *E. coli* Einzeldomänen-Rhodanese YgaP näher charakterisiert worden. Anhand von *in vitro* Assemblierungs-Analysen konnte eine zusätzliche Interaktion von YnjE und der großen MPT-Synthase Untereinheit MoaE beobachtet werden. Durch die im Hefe Two-Hybrid identifizierte *in vivo* Interaktion von YnjE und der *E. coli* Sulfurtransferase IscS wurde gezeigt, dass eine Persulfurierung von YnjE *in vitro* durch IscS mit L-Cystein als Schwefelquelle erfolgen könnte. Mit IscS als Schwefeldonor konnte YnjE *in vitro* den Schwefel auf MoaD übertragen und die MPT-Synthase aktivieren. Diese Ausbildung der Persulfidbindung konnte sowohl an der Konformationsänderung der Sekundärstruktur in der CD-Spektroskopie als auch massenspektrometrisch bestätigt werden. Allerdings wurde gezeigt, dass am N-Terminus von YnjE eine Signalsequenz von 28 Aminosäuren deletiert wird.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meiner Mentorin Prof. Dr. Silke Leimkühler für Ihre Unterstützung und Förderung. Ihre Zuversicht in diese Arbeit half mir so manche nicht auszubleibende Schwierigkeit zu überwinden. Vor allem möchte ich mich für die Gelegenheit des Besuches anderer Laboratorien im Ausland bedanken, im Rahmen dessen ich viele neue Arbeitsmethoden kennen gelernt habe.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Ralf-R. Mendel für sein Interesse an dieser Arbeit, seine Unterstützung und die Möglichkeit in seinem Labor arbeiten zu dürfen.

Andreas Matthies, Jennifer Schmitz, Antje Schulte und Annika Krause möchte ich für die schöne gemeinsame Zeit im Labor danken. Die anregenden Gespräche und die mir entgegengebrachte Unterstützung haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meinen Freunden Berenike Kleinhenz, Manou Fabienke, Annika Guse und Gerrit Gutzke kann ich gar nicht genug danken für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft und Motivation – sowohl in wissenschaftlichen als auch in freundschaftlichen Dingen.

Meinen ganzen Kollegen der Arbeitsgruppe Mendel danke ich für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Laboratmosphäre; jeder Einzelne von ihnen hat auf seine Art und Weise dazu beigetragen.

Meinen Eltern, meinen Geschwistern Björn und Catharina – vor allem aber meinem Mann Stefan – danke ich für die bedingungslose Unterstützung und Motivation. Ohne Euch wäre soviel nicht möglich gewesen.

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären wenn man nach Zeit und Umständen das Mögliche getan hat.“

Johann Wolfgang von Goethe